

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



Bc. Jakub Skřivánek

**Reakce na opakované působení vybraných abiotických stresových faktorů u dvou
poddruhů olivovníku evropského**

Response to repeated exposure to selected abiotic stress factors in two subspecies of olive

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Hana Konrádová, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tu závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis:

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval všem, kteří mi při vypracovávání této diplomové práce pomáhali a psychicky mě podporovali. Dále bych rád poděkoval kolektivu laboratoře 007 za velmi přátelskou a tvůrčí atmosféru. Nejdůležitější poděkování patří RNDr. Haně Konrádové, Ph.D a doc. RNDr. Heleně Lipavské, Ph.D za jejich cenné a podnětné rady, za velmi laskavý a trpělivý přístup v průběhu vedení celé práce. Zvláštní poděkování patří mé rodině a nejbližším, kteří mě vytrvale podporují již od začátku studia.

Abstrakt

Olivovník evropský (*Olea europaea* L.) patří mezi nejstarší kulturní plodiny světa, jde o dlouhověký strom schopný snášet vysoké teploty za omezeného přísunu vody, zhoršené půdní poměry, ale také teploty pod bodem mrazu během zimního období. Práce je zaměřena na charakterizaci stresové odpovědi olivovníku evropského vůči vybraným stresovým faktorům (nedostatek vody, zasolení, chlad) na úrovni vybraných antioxidačních systémů a snaží se zodpovědět otázku, zda se charakter těchto odpovědí mění v případě opakovaného působení stresového faktoru. Významnou složkou stresové odpovědi je u řady rostlin změna sacharidové bilance zahrnující jak změny celkového obsahu sacharidů, tak jejich spektra. Vzhledem k potenciálu rozpustných sacharidů zhaset volné radikály a bohatosti sacharidového spektra olivovníku je zvláštní pozornost věnována studiu akumulace jednotlivých skupin sacharidů s ochranným potenciálem.

Optimalizovali experimentální kultivační podmínky kultivace *in vitro* pro dva poddruhy olivovníku – kulturní (kultivar Picual) a planý (ssp. *laperrinei*). Nepodařilo se nalézt podmínky zajišťující uspokojivý růst fotoautotrofní kultury. V experimentech simulujících nedostupnost vody přidáním PEG do kultivačního média jsme opakovaně ověřili, že použití PEG 4000 a 6000 má v našem experimentálním designu silně negativní účinek na růst rostlin, což znemožnilo provedení experimentů v zamýšleném rozsahu. V uspořádání simulujícím opakované zasolení jsme pozorovali akumulaci manitolu, která vykazovala paměťový charakter.

Z hlediska sledování vlivu opakovaného stresu se nám jako nejvhodnější jeví experimentální model zahrnující působení suboptimálních teplot, kde se nám podařilo získat nejvíce dat o reakci kulturního olivovníku. Za použití tohoto uspořádání jsme získali i data o reakci plané formy olivovníku, u něhož jsou odpovědi na stresové faktory zatím neznámé. Společnou reakcí obou poddruhů bylo navýšení sacharosy, která v případě kulturního olivovníku v jednom opakování vykazovala paměťový charakter. U kulturního olivovníku byla navíc častou reakcí akumulace celkových rozpustných sacharidů. Vůči našemu prvotnímu předpokladu se zdá, že námi studovaný planý poddruh (*Olea europaea* ssp. *laperrinei*) je méně odolný vůči chladu než jeho domestikovaný příbuzný.

Klíčová slova: antioxidanty, planý olivovník, kultivace *in vitro*, manitol, *Olea europaea*, sacharidy, sacharidy farinózové řady, stresová paměť

Abstract

Olive tree (*Olea europaea* L.) is one of the world's oldest domesticated crops, a long-living tree capable to withstand periods of high temperatures with limited water supply, deteriorated soil conditions, but also exposure to freezing temperatures during winters. The work is focused on the characterization of stress responses of olives to selected stress factors (drought, salinity, cold) at the level of antioxidant systems and aims to answer the question whether the nature of these responses changes due to repeated exposure to the stress factor. In many plants, an important component of the stress response is the adaptation of carbohydrate balance, including changes in the total carbohydrate content as well as in their spectrum. Due to the potential of soluble carbohydrates to quench free radicals and due to the diversity of the olive carbohydrate spectrum, special attention has been paid to the study of accumulation of individual groups of carbohydrates with protective potential.

We have optimized experimental *in vitro* cultivation conditions for two subspecies of olive tree - domesticated (Picual cultivar) and wild one (ssp. *laperrinei*). It was impossible to find conditions ensuring satisfactory growth of the photoautotrophic culture. In experiments simulating the water shortage by adding PEG to the culture medium, we repeatedly verified that the use of PEG 4000 and 6000 has a strong negative effect on olive growth at our experimental design. Therefore, it was not possible to perform the experiments employing PEG to the planned extent. In the arrangement simulating repeated exposure to salt, the accumulation of mannitol was observed, which showed a memory character.

For monitoring the effect of repeated stress, an experimental model involving the action of suboptimal temperatures seemed to be the most suitable. Using this arrangement, we also obtained data on the response of the wild olive, for which the information on reactions to stress factors are not yet available. The common reaction of both subspecies was an increase in sucrose proportion, which in the case of domesticated olive showed a memory character in one repetition of the experiment. In addition, the reaction comprising of accumulation of total soluble carbohydrates was frequent in domesticated olive. Contrary to our primary assumption, it appears that the wild subspecies (*Olea europaea* ssp. *laperrinei*) is not as resilient against cold as its domesticated relative.

Key words: antioxidants, carbohydrates, *in vitro* cultivation, mannitol, *Olea europaea*, raffinose family oligosaccharides, stress memory, wild olive tree

Seznam použitých zkratek

$^1\text{O}_2$	singletní kyslík
APX	askorbátperoxidasa
CAT	katalasa
SOD	superoxiddismutasa
dH ₂ O	demineralizovaná voda
DW	suchá hmotnost
FW	čerstvá hmotnost
GPOX	guaiakolperoxidasa
GR	glutathionreduktasa
GSH	glutathion (redukována forma)
GSSG	glutathion (oxidovaná forma)
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
MS	(Murashige and Skoog) médium
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
O ₂ ^{•-}	superoxidový anion
OH [•]	hydroxilový radikál
PAL	fenylalaninamoniumlyasa
PEG	polyethylenglykol
POD	peroxidasa
PP	polypropylen
RFO	sacharidy rafinózové řady
ROS	reaktivní formy kyslíku

1	Úvod.....	1
1.1	Cíle práce.....	2
2	Literární úvod.....	4
2.1	Rostliny a oxidativní stres	4
2.1.1	Tvorba reaktivních forem kyslíku	4
2.1.2	Antioxidační ochrana	4
2.1.2.1	Enzymatická antioxidační ochrana	5
2.1.2.2	Neenzymatická antioxidační ochrana	5
2.2	Olivovník evropský	6
2.2.1	Olivovník a stres z nedostatku vody	8
	Obranné mechanismy olivovníku vůči stresu z nedostatku vody	9
2.2.2	Olivovník a zasolení.....	11
2.2.3	Olivovník a působení suboptimálních teplot.....	13
2.3	Stresová paměť.....	16
3	Materiál a metody	18
3.1	Rostlinný materiál	18
3.1.1	Původ rostlinného materiálu.....	18
3.1.2	Kultivační postupy	18
3.1.2.1	Podmínky kultivačního boxu č. 1 („udržovací box“).....	18
3.1.2.2	Podmínky kultivačního boxu č. 2 („box pro chladové experimenty“).....	19
3.1.3	Standartní udržovací média.....	19
3.1.3.1	Práce v aseptickém prostředí.....	21
3.1.3.2	Výroba polopropustných víček.....	21
3.1.4	Experimentální ošetření materiálu	21
3.1.4.1	Experimentální média.....	21
3.1.4.2	Chladové působení.....	21
3.2	Metodiky měření	22
3.2.1	Měření růstových charakteristik.....	22
3.2.2	Odebírání vzorků a jejich následné uchovávání.....	22
3.2.3	Stanovení obsahu nestrukturních sacharidů	22
3.2.4	Stanovení obsahu askorbátu	23
3.2.5	Stanovení míry úniku elektrolytů z pletiv	24
3.2.6	Stanovení obsahu antokyanů.....	24
3.2.7	Stanovení aktivity antioxidačních enzymů	25
3.2.7.1	Extrakce proteinů.....	25
3.2.7.2	Stanovení obsahu proteinů.....	26
3.2.7.3	Stanovení enzymatické aktivity	26
3.2.8	Zpracování dat.....	28
3.3	Experimenty	29
3.3.1	Schéma kultivací pod polopropustnou membránou	29
3.3.1.1	Design A.....	29
3.3.2	Schémata kultivací pod alobalovým víčkem.....	29
3.3.2.1	Design B (Schéma pro PRIMUS 10).....	29
3.3.2.2	Design C	29
3.3.3	Přehled experimentů.....	30
4	Výsledky	33
4.1	Experimenty s <i>Olea europaea</i> cv. Picual (kulturní olivovník)	33
4.1.1	Optimalizace kultivačních podmínek.....	33
4.1.1.1	Vliv koncentrace sacharidů v médiu na růstové charakteristiky oliv kultivovaných v podmínkách in vitro (Primus 2).....	33
4.1.1.2	Vliv typu sacharidu na růstové charakteristiky, obsah a zastoupení rozpustných sacharidů u kulturního olivovníku (Primus 3).....	36

4.1.2	Reakce olivovníku na indukovaný stres z nedostatku vody, zasolení a způsob uzavření nádoby	38
4.1.2.1	Vliv PEG 4000 na růstové charakteristiky a obsah a zastoupení rozpustných sacharidů (Primus 4, Primus 5)	38
4.1.2.2	Vliv PEG 4000 na růstové charakteristiky a obsah askorbátu (Primus 6)	40
4.1.2.3	Vliv PEG 6000 na růstové charakteristiky, obsah a zastoupení rozpustných endogenních sacharidů (Primus 7)	40
4.1.2.4	Vliv typu víčka na růstové charakteristiky, obsah a zastoupení sacharidů u kulturního olivovníku 43	
4.1.2.5	Vliv opakovaného stresu zasolení na růstové charakteristiky, obsah a zastoupení endogenních rozpustných sacharidů u olivovníku (Primus 10)	45
4.1.3	Reakce olivovníku na opakované působení suboptimálních teplot	47
4.1.3.1	Vliv opakovaného působení nízkých teplot na obsah endogenních rozpustných sacharidů (Primus 9)	47
4.1.3.2	Vliv opakovaného působení nízkých teplot na růstové charakteristiky, obsah a zastoupení endogenních rozpustných sacharidů (Primus 12) – opakování Primus 9	49
4.1.3.3	Vliv opakovaného působení nízkých teplot na růstové charakteristiky, míru úniku elektrolytů, obsah antokyanů a aktivitu antioxidantních enzymů (Primus 13)	51
4.2	Experimenty s <i>Olea europaea</i> ssp. <i>laperrinei</i> (planý poddruh olivovníku)	55
4.2.1	Reakce olivovníku na opakované působení suboptimálních teplot	55
4.2.1.1	Vliv opakovaného chladového působení na růstové charakteristiky, obsah a zastoupení sacharidů (Primus 11)	55
4.2.1.2	Vliv opakovaného chladového působení na růstové charakteristiky, míru uniku elektrolytů, obsah a zastoupení endogenních sacharidů a aktivitu antioxidantních enzymů (Primus 14)	58
5	Diskuse	62
5.1	Optimalizace experimentálních kultivací	62
5.2	Reakce olivovníku na simulovaný stres z nedostatku vody a zasolení	64
5.3	Reakce olivovníků na opakované působení suboptimálních teplot	68
6	Závěry	72
7	Seznam literatury	73

1 Úvod

Rostliny jsou sesilní organismy a díky takovému způsobu života musí čelit neustálým změnám okolního prostředí. Rostliny mají velkou kapacitu tolerovat okolní nestálé podmínky. Dlouhodobější vychýlení od optimálních podmínek vyvolá u rostliny stresovou reakci, která může vést k energetickému vyčerpání a následné smrti rostliny. Stejně tak extrémní a rychlé vychýlení od optimálních podmínek vede k podobnému osudu, jelikož rostlina nedokáže zmobilizovat ochranné systémy.

Stresové faktory můžeme dělit několika způsoby, mezi nejrozšířenější dělení patří to podle povahy stresového faktoru na abiotické (neživého původu) a biotické (živého původu). Mezi abiotické faktory například patří stres z nedostatku vody, zaplavení půdy, nutriční deficiencie, zasolení, stres z nízkých či vysokých teplot či nadměrná ozářenost. Mezi biotické faktory můžeme zařadit například působení bakterií, virů, hub, hlístic, hmyzu a dalších organismů žijících se rostlinnou potravou.

Pokud dochází ke zvýšení odolnosti na základě fyziologického nebo morfologického přizpůsobení při stresové odpovědi, hovoříme o aklimaci. Pokud je odolnost vůči stresovému faktoru dána geneticky v celé populaci, hovoříme o adaptaci. Prvotní působení stresového stimulu o nízké intenzitě může rostliny svým způsobem připravit na stresové reakce, které se mohou vyskytnout v budoucnu, takové rostliny pak bývají krátkodobě odolnější vůči danému stresu, takovému jevu se říká priming. Rostliny dokážou informaci o prodělaném stresu uchovávat různě dlouhou dobu – od několika dní až po několik roků či dokonce po celý život (Lämke a Bäurle, 2017). Pokud dochází k uchování informace o prodělaném stresu, hovoříme o stresové paměti.

Většina prací studující podobné jevy používá zavedené modely experimentální a molekulární biologie jako je např. *Arabidopsis thaliana*, které ovšem mají malou vypovídající hodnotu pro strategie kulturních plodin. Kulturní plodiny nejčastěji využívané ke studiu stresu (rýže, kukuřice, pšenice, brambor, ...), nedovolují studium stresových strategií rostlin s přirozeně bohatým spektrem sacharidů, případně kulturních dlouhověkových plodin jako je olivovník.

1.1 Cíle práce

Cílem práce bylo zjistit, zda některé složky stresové odpovědi olivovníku evropského vykazují znaky stresové paměti, a tak se mohou uplatňovat při obraně proti opakovanému stresu. Pro splnění hlavního cíle byly vybrány následující analýzy: růstové charakteristiky, sacharidová bilance a odpovědi dalších vybraných složek antioxidačního systému olivovníku při jednorázovém a opakovaném vystavení vybraným stresovým faktorům u kulturního a planého olivovníku kultivovaného v podmínkách *in vitro*.

Hypotézy:

- 1) Vystavení rostlin olivovníku primingovému působení má benefiční vliv při následném vystavení silnějšímu stresovému působení (stresová paměť)
- 2) Stresová paměť se projeví akumulací určitých rozpustných sacharidů či jiných nízkomolekulárních antioxidantů vyvolanou primingovým působením (působením podkritickou úrovní stresoru) a přetrvá po odeznění stresu
- 3) Stresová paměť se projeví zvýšenou aktivitou antioxidačních enzymů přetrvávající i po odeznění stresu
- 4) Reakce divokého olivovníku na působení suboptimálních teplot a schopnost zapamatovat si předchozí stresové působení bude odlišná v porovnání s kulturním olivovníkem

Dílčí cíle:

- Optimalizace kultivačního protokolu obou poddruhů oliv pro studium dané problematiky.
 1. Porovnání vhodnosti jednotlivých zdrojů uhlíku v kultivačním médiu (sacharóza vs. manitol, případně jejich kombinace).
 2. Testování možnosti fotoautotrofní kultivace *in vitro*.
 3. Výběr otužovací/subkritické úrovně stresového působení (priming) pro navození zvýšené tolerance k následnému vážnějšímu stresu
- Sledování vybraných charakteristik kulturních oliv v reakci na stres suchem, zasolením a chladem – během stresové fáze a při následné fázi zotavení.
 1. Stanovení základních růstových parametrů rostlin;
 2. Sledování dynamiky obsahu rozpustných sacharidů s důrazem na podíly sacharosy, manitolu a RFO v sacharidovém spektru;
 3. Sledování hladin vybraných nízkomolekulárních antioxidantů;
 4. Sledování aktivit vybraných antioxidačních enzymů: včetně zavedení a optimalizace metodiky na pracovišti
- Pomocí stanovení míry úniku elektrolytů posoudit úroveň poškození membrán
- Vytipovat parametry, které jsou podstatou stresové paměti
- Propojit všechny získané výsledky a vytipovat charakteristiky indikující zvýšenou odolnost ke klimatickým výkyvům u kulturních a divokých oliv.

2 Literární úvod

2.1 Rostliny a oxidativní stres

2.1.1 Tvorba reaktivních forem kyslíku

Je známo, že celá řada primárních stresů u rostlin je doprovázena stresem oxidativním. Tento sekundární stres je způsoben především nepoměrem mezi zvýšenou tvorbou reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species – ROS) a jejich degradací. Místem, kde vzniká největší množství ROS jako důsledek abiotických faktorů je thylakoidní membrána chloroplastu (Pospíšil, 2009). Zde dochází k tvorbě superoxidového anionu ($O_2^{\cdot-}$) hlavně při světelné části fotosyntézy ve fotosystému I. Při nadměrném ozáření totiž dochází k přesycení elektronového transportního řetězce, to vede k přenosu části elektronů na molekulu O_2 (Mehlerova reakce) za vzniku $O_2^{\cdot-}$, ten je následně buď spontánně, nebo pomocí superoxiddismutasy přeměněn na peroxid vodíku (H_2O_2). H_2O_2 se v přítomnosti vhodného přechodného kovu může rozkládat (Fentonova reakce) na hydroxylový radikál (OH^{\cdot}). Ve fotosystému II může docházet k tvorbě singletního kyslíku (1O_2). ROS způsobují peroxidaci polynenasycených mastných kyselin, což vede ke snížení fluidity membrán, to narušuje jejich integritu a může způsobovat sekundární poškození membránových proteinů (Halliwell, 2006). ROS ale také mohou poškodit i další buněčné makromolekuly – nukleové kyseliny a proteiny. $O_2^{\cdot-}$ a OH^{\cdot} jsou tzv. volné radikály a jsou to vysoce reaktivní molekuly s velmi krátkým poločasem rozpadu, podněcují vznik dalších radikálů a nemohou procházet skrze membrány, proto musí být zhašeny okamžitě v místě vzniku. Proti tomu H_2O_2 a 1O_2 jsou tzv. neutrální formy ROS, které jsou méně reaktivní a mohou procházet skrze membrány. ROS v rostlinném těle nemají jen nežádoucí efekty, plní také úlohu důležitých informačních molekul (Baxter a kol., 2014) a účastní se zpevňování buněčné stěny.

2.1.2 Antioxidační ochrana

Existence funkčního antioxidačního systému je nezbytnou součástí ochrany před negativním působením nadměrně vznikajících ROS jako důsledek působení stresových stimulů. Antioxidační systémy můžeme dělit na 1) enzymatické kam patří např. askorbátperoxidasa (APX), glutathionreduktasa (GR), peroxidasa (POD), guaiakolperoxidasa (GPOX) superoxiddismutasa (SOD), katalasa (CAT); 2) neenzymatické kam můžeme zařadit zhaščeče jako je např. askorbát, oleuropein, prolin nebo některé sacharidy. Mezi ochranné systémy můžeme zařadit i disipační fotoprotektivní molekuly jako jsou karoteny a xantofyly, ty rozptylují nadbytečnou energii přímo v místě potenciálního vzniku ROS v plastidu (Young, 1991).

2.1.2.1 Enzymatická antioxidační ochrana

Guaiaakolperoxidasa je enzym zbavující buňku přebytku H_2O_2 , mimo jiné hraje důležitou roli při biosyntéze ligninu (Tayefi-Nasrabadi a kol., 2010).

Katalasa je enzym katalyzující dismutaci H_2O_2 na vodu a O_2 , vyskytující se hlavně v peroxisomech (Ahmad a kol., 2010).

Peroxidasa (III. třídy) je multifunkčním enzymem vyskytující se ve vakuole, buněčné stěně a apoplastu. Katalyzuje oxidaci různých substrátů (převážně fenolických sloučenin) pomocí H_2O_2 . Některé izoenzymy jsou zapojeny do procesů lignifikace, suberinizace a zesíťování buněčné stěny díky tomu, že mají schopnost katalyzovat produkci H_2O_2 (Veljović Jovanović a kol., 2018).

Ascorbátperoxidasa je důležitým enzymem v askorbát-glutathionovém cyklu redukující H_2O_2 na H_2O (Ahmad a kol., 2010). V rostlinné buňce se vyskytuje v různých izoformách, thylakoidní a mikrosomální patří mezi membránové izoformy a stromatální, cytosolické a apoplastické patří mezi rozpustné izoformy (Noctor a Foyer, 1998).

Superoxiddismutasa je enzym konvertující $\text{O}_2^{\bullet-}$ na H_2O_2 , podle přítomnosti kovů v aktivním místě je dělíme Cu/Zn SOD (obsahující měď a zinek), MnSOD (obsahující mangan) a FeSOD (obsahující železo). Cu/Zn SOD se vyskytuje v rostlinné buňce v cytosolu a chloroplastech, MnSOD se vyskytuje v matrix mitochondrií a peroxisomech (Ahmad a kol., 2010).

2.1.2.2 Neenzymatická antioxidační ochrana

Prolin je aminokyselina se širokým spektrem ochranných účinků (Liang a kol., 2013). Je to účinný osmoprotektant vyrovnávající osmotické poměry v buňce. Prolin je také dobrým zhášecem OH^{\bullet} (hydrogenovou abstrakcí dochází k tvorbě stabilního radikálu, který je méně škodlivý) a $^1\text{O}_2$ (pětičlenný kruh prolinu pyrrolidin s nízkým ionizačním potenciálem přenáší náboj ze singletního kyslíku a tím vrací kyslík do základního stavu) (Matysik a kol., 2002). Prolin také dokáže v rostlinách potlačit produkci $^1\text{O}_2$ vznikající v tylakoidech (Alia a kol., 1997).

Fenolické sloučeniny jsou sekundární metabolity rostlin tvořené aromatickým kruhem s minimálně jednou připojenou hydroxylovou skupinou. Jedná se o širokou skupinu látek zahrnující flavonoidy, taniny a mnoho dalších. Fenolické sloučeniny jsou výbornými zhášeci ROS, jelikož mají nižší elektron redukční potenciál než kyslíkové radikály (Grace, 2005). Další výhodou fenolických látek je, že zhášejí ROS přímo a inaktivují je bez vytváření dalších oxidativních reakcí (Grace, 2005).

Mezi neenzymatické zhášeci ROS můžeme zařadit i sacharidy. Práce Keunen a kol. (2013) shrnuje, které sacharidy mají potenciál zhášet ROS – fruktany, sacharidy rafinózové řady

(RFO), disacharidy (sacharosa, trehalosa), monosacharidy (glukosa, fruktosa), lineární (např. manitol) i cyklické (galaktinol). Většina prací týkající se schopnosti sacharidů zhášet ROS, na které Keunen a kol. (2013) odkazují, je provedena *in vitro* a zaměřují se hlavně na schopnosti sacharidů zhášet OH•. Práce Peshev a kol. (2013) však popisuje model zhášení OH• pomocí fruktanů, kde ústřední roli hraje vakuolární systém buňky a v ní přítomné fenolické sloučeniny. Práce Matros a kol. (2015) přináší jako jedna z mála důkazy, že sacharidy ve vyšší koncentraci mohou fungovat jako zhášeče ROS *in planta*, práce se zaměřuje na schopnost sacharosy zhášet OH•. Rozpustné sacharidy ve vyšších koncentracích mají také ochrannou funkci jako osmoprotektanty a některé i jako kryoprotektanty.

Kyselina askorbová (askorbát) je dalším účinným antioxidantem, které rostliny syntetizují a akumulují. Biosyntéza v rostlinách probíhá hlavně z D-glukosy (Ahmad a kol., 2010). Askorbát přímo reaguje s hydroxylovým radikálem, superoxidovým anionem i singletovým kyslíkem (Ahmad a kol., 2010). Dále je askorbát součástí askorbát-glutathionového cyklu, kde reaguje s peroxidem vodíku za přítomnosti enzymu APX, při této reakci vzniká monodehydroaskorbát nebo dehydroaskorbát. Monodehydroaskorbát může být přímo redukován zpět na askorbát za přítomnosti enzymu monodehydroaskorbátreduktasy, dehydroaskorbát pak za přítomnosti redukováného glutathionu (a dehydroaskorbátreduktasy) (Ahmad a kol., 2010)

Glutathion je tripeptid (γ -glutamylcysteinylglycin) vyskytující se hlavně v chloroplastech ve formě redukované (GSH), detekovaný však byl i v ostatních buněčných kompartmentech a vyskytuje se také ve formě oxidované (GSSG). Regenerace z GSSG na GSH je katalyzována enzymem glutathionreduktasou za spotřeby NADPH. GSH zháší H₂O₂ a také reaguje s dalšími ROS, konkrétně se singletovým kyslíkem, superoxidovým radikálem a hydroxylovým radikálem (Ahmad a kol., 2010). Další důležitou rolí GSH je schopnost regenerovat askorbát skrze askorbát-glutathionový cyklus (Millar a kol., 2003).

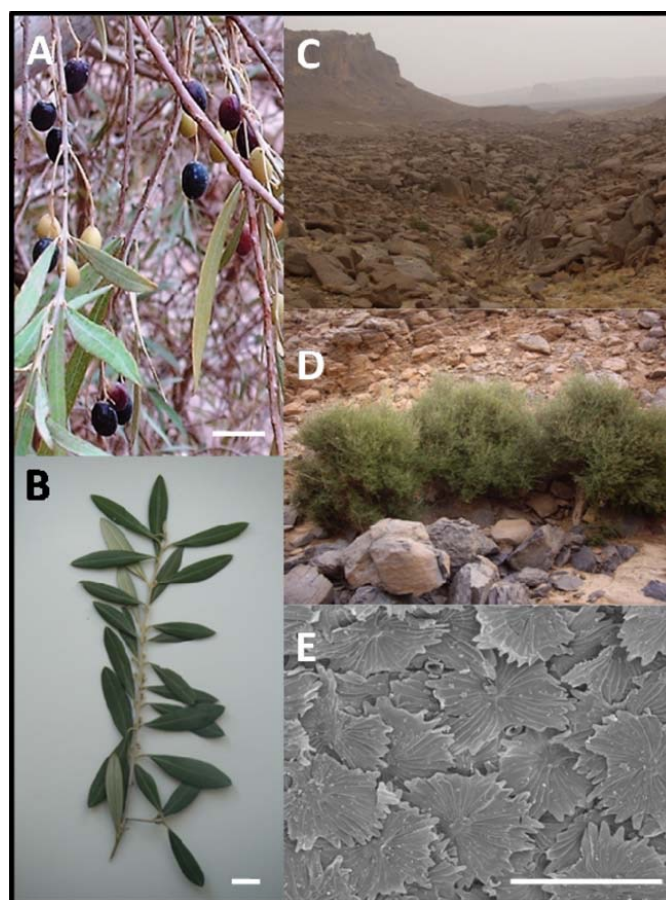
2.2 Olivovník evropský

Rod *Olea* obsahuje více než 30 druhů s širokým rozšířením napříč Evropou, Asií, Oceánií a Afrikou. Pouze jediný druh *Olea europaea* L. byl kultivován člověkem (Preedy a Watson, 2010). Jsou popsány dvě koexistující formy tohoto druhu – planá (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*) a kultivovaná (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*). Dnes čítáme stovky kultivarů u kultivované formy tohoto stromu.

Olea europaea L. dnes patří mezi nejdůležitější plodiny suchých a polosuchých oblastí subtropického pásma. Tyto dlouhověké stromy mají schopnost růst a tvořit plody přijatelné kvality i v drsných podmínkách, ve kterých „klasické kulturní plodiny“ selhávají (Fernández,

2014). Hlavním produktem olivovníku jsou plody, ze kterých se lisováním získává olej. Ten je považován za klíčovou ingredienci vyvážené stravy jak odborníky na výživu, tak i konzumenty. Olivový olej je bohatý na prospěšné látky jako je množství různých fenolických látek fungujících hlavně jako antioxidanty a také má vysoký podíl nenasycených mastných kyselin. Fenolické látky jsou jedním z důležitých indikátorů kvality olivového oleje, sledují se však i v listech. Rannali a kol. (2006) popisují, že obsah fenolických látek v listech u olivovníku je ovlivněn mnoha genetickými faktory, dále také stářím nebo dobou sběru.

Rozlišujeme pět planých příbuzných poddruhů kultivovaného Mediteránního olivovníku – *laperrinei*, *cuspidata*, *guanchica*, *maroccana* a *cerasiformis* (Green, 2002). *Olea europaea* subsp. *laperrinei* („olivovník Laperrinův“) je velmi odolný endemitní poddruh žijící v horských regionech centrální Sahary (Anthelme a kol., 2008). Morfologické charakteristiky přibližuje obrázek č.1. Tento poddruh je považován v dnešní době za ohrožený vymřením (Haddad a kol., 2018). Studium podobných planých druhů a poddruhů je slibným zdrojem genů rezistence vůči nedostatku vody a patogenům (Hannachi a kol., 2009). Baali-Cherif a Besnard (2005) popisují u tohoto planého poddruhu velmi omezenou schopnost plodit a dodávají, že přírodní regenerace tohoto druhu je velmi nízká. Anthelme a kol. (2008) dokazují, že přeživší přírodní populace tohoto poddruhu se množí převážně asexuálně. Baali-Cherif a Besnard (2005) popsali v přírodních populacích na území Alžírsko výskyt triploidních jedinců vykazujících větší vitalitu, avšak tyto triploidní jedinci jsou sterilní a nemohou se rozmnožovat pomocí semen. Množení tohoto poddruhu v podmínkách *in vitro* je nadějnou metodou pro jeho zachování (včetně možnosti kryoprezervace) a zkoumání jeho genetického potenciálu pro šlechtění. Dosud však chybí jakékoli informace o metabolických odpovědích na stresové podmínky, chybí i informace ohledně fyziologických a metabolických charakteristik u tohoto poddruhu za „optimálních“ nestresových podmínek. Naše práce je tak jednou z prvních, která nabízí možnost udělat si alespoň základní obrázek o odpovědi sacharidového metabolismu v případě chladového působení na tento druh a také nabízí srovnání s kulturním genotypem.



Obrázek č.1: Morfologické charakteristiky *Olea europaea* subsp. *laperrinei*. (A) Zralé plody v přirozeném prostředí. Měřítko 1 cm. (B) Hybrid *laperrinei* x *europaea*. Měřítko 1 cm. (C) Přirozený habitat na úpatí hory Akerakar v Hoggarském pohoří. (D) Tři klony ze stejného pahýlu (Hoggarské pohoří) (E) Snímek z elektronového mikroskopu zobrazující abaxiální stranu listu. List je hustě pokrytý velkým počtem štítovitých trichomů, které chrání průduchy před nadměrnou ztrátou vody. Měřítko 200 μ m (převzato z Besnard a kol., 2012)

2.2.1 Olivovník a stres z nedostatku vody

Olivovník je obecně velmi odolný druh, co se týká nedostatku vody v půdě (Bacelar a kol., 2004). Dokáže čelit velmi silnému nedostatku vody díky anatomickým adaptacím listů jako jsou vyvinuté kutikulární vosky, stomata vyskytující se pouze na abaxiální straně listu, a navíc ještě bohatě kryta trichomy (Edziri a kol., 2020). Mezi typické makroskopické projevy olivovníku při nedostatku vody patří sklopení listů, urychlení senescence a následované odpadem listů, jak shrnuje ve svém review z roku 2018 Sebastiani. Nedostatek vody má negativní vliv i na výnos olivovníku a akumulaci olejů v plodech (Greven a kol., 2009). Ukazuje se také, že nedostatek vody v určité fázi dozrávání plodů má i pozitivní účinek na rychlost dozrávání plodů (Gómez-Rico a kol., 2007). Umělé přerušení závlahy v určité fázi vývoje je také častou agronomickou technikou, jak docílit lepší chuťové kvality oleje, hlavně díky vyššímu obsahu fenolických látek (Gómez-del-Campo a García, 2012). Ovšem Servilli a

kol. (2009) dodávají, že takové oleje někdy mají až nepřiměřeně hořkou chuť. Jak ukazuje také práce z roku 2019 autorů Jiménez-Herrera a kol., nedostatek vody může mít zásadní vliv na obsah pentacyklických triterpenů a některých fenolů, které stojí za zdravotními benefity olivového oleje. V jejich experimentu došlo k poklesu obsahu většiny těchto látek u té skupiny rostlin, která byla vystavena nedostatku vody. Zmiňují také, že pokud nedostatek vody postihne rostliny olivovníku během časně fáze dozrávání plodů, má to dramaticky negativní vliv na velikost takových plodů.

Obranné mechanismy olivovníku vůči stresu z nedostatku vody

Je popsáno několik mechanismů, jak se rostliny olivovníku dokážou s tímto typem stresu vypořádat, a to jak na úrovni fyziologické, tak i na úrovni biochemické. Některé z nich budou podrobněji popsány níže. Většina níže prezentovaných studií je situována do prostředí *in vitro*, jelikož zde lze snadno studovat působení jednotlivých stresových faktorů odděleně (Hegazi a kol. 2018, Silvestri a kol. 2017). Užití *in vitro* kultivace s sebou přináší i určité nedostatky – problematičnost navození sucha, omezenou možnost aplikace výsledků na reálně rostoucí rostliny, jinou míru diferenciací pletiv – především strukturních bariér proti suchu apod. Budou také přiblíženy výsledky dvou studií (Yamani a kol., 2019; Ben Abdallah a kol., 2017), která jsou situovány do podmínek *in vivo* v sadovém prostředí či prostředí skleníku.

Již v roce 1999 autoři Chartzoulakis a kol. popsali, že u rostlin olivovníku vystavených nedostatku vody dochází ke snížení osmotického potenciálu buněk (zřejmě jako důsledek akumulace kompatibilních solutů) a jedná se tak zřejmě o aktivní osmotické přizpůsobení se daným nepříznivým podmínkám. Bacelar a kol. (2014) popsali několik anatomických přizpůsobení u různých kultivarů olivovníku vůči stresu z nedostatku vody. Jednalo se například o zvýšení sklerofytčnosti listů budováním parenchymatických pletiv a zesilováním svrchní kutikuly, autoři popisují, že takové listy mají větší odolnost proti vadnutí. Mezi další adaptace popsané stejnými autory patří vyšší poměr palisádového/houbovitého parenchymu, silná kutikula a mocnější vrstva trichomů. Dalším způsobem, jak olivovníky mohou snížit ztráty vody na úrovni celé rostliny, je vytváření menších listů.

Experimenty s využitím kultivace *in vitro*

Aplikace polyethylenglykolu (PEG) do média při kultivaci *in vitro* je jednou z nejspolehlivějších metod pro vyvolání stresu z nedostatku vody (Rai a kol. 2011). Mezi výhody vysokomolekulárních PEG patří to, že jsou interní a nepenetrují do buněk, díky tomu nejsou většinou toxické pro rostlinné explantáty. PEG se proto běžně používá pro sledování různých genotypů oliv a jejich odpovědí na stres z nedostatku vody (viz. Rai a kol., 2011; Silvestri a kol., 2017; Hegazi a kol., 2018).

Hegazi a kol. (2018) ve své práci zkoumali efekt PEG 6000 na rostliny *Olea europaea* kultivované *in vitro*. V této práci používal koncentrace PEG 25, 50 a 75 g/L. Se vzrůstající koncentrací se snižoval přírůstek průměrné hmotnosti i délka nadzemní části. Míra přežití rostlin s nejvyšší koncentrací PEG v médiu činila 64 %. V odebraných vzorcích listů také měřili obsah prolinu, jehož obsah vykazoval signifikantní růst v závislosti na vzrůstající koncentrací PEG v médiu. Při nejvyšší koncentraci PEG obsah prolinu činil průměrně 8,71 mmol/100 g FW (kontrola 7,42 mmol/100 g FW).

Silvestri a kol. (2017) popisují ve své práci reakci rostlin *Olea europaea* kultivovaných *in vitro* na médiu obsahující PEG 8000 v koncentraci 0 %, 1 %, 2 % a 4 %. Sledovali základní růstové parametry, stanovili obsah prolinu a aktivitu antioxidantních enzymů v nadzemní části. Zvyšující se koncentrace PEG vyvolala snižování délky nadzemní části a délky internodií, při obsahu 1 % PEG v médiu dosahovaly nadzemní části délky 11,5 cm, při 2 % PEG 6,7 cm, při 4 % PEG 3,9 cm a kontrolní rostliny dosahovaly 20,3 cm. Je zajímavé, že se se zvyšující koncentrací PEG signifikantně neměnil poměr čerstvé hmoty ku sušině (0,18 kontrola vs. 0,25 pro jednotlivé koncentrace PEG). Obsah prolinu v listech se signifikantně nelišil mezi kontrolou a rostlinami ošetřenými nejvyšší koncentrací PEG (4 %), činil přibližně 100 µg/g FW, zatímco rostliny ošetřené 1 % a 2 % PEG vykazovaly signifikantní nárůst obsahu prolinu a to přibližně 200 µg/g FW (Silvestri a kol., 2017). Ve stejné práci je také sledována aktivita dvou antioxidantních enzymů – katalasy a guaiakolperoxidasy. Aktivita CAT se neměnila s žádnou použitou koncentrací PEG. Aktivita GPOX vykazovala v porovnání s kontrolou signifikantně vzrůstající trend u ošetření 1 % a 2 % PEG, u ošetření 4 % PEG byla aktivita na stejné úrovni jako u 2 % PEG. Autoři zmiňují, že větší zapojení guaiakolperoxidasy zřejmě reflektuje probíhající změny buněčných stěn, které jsou modifikovány jako součást adaptivní odpovědi na stres z nedostatku vody.

Experimenty *in vivo*

Z pohledu antioxidantní kapacity a stresové paměti se přibližuje mému tématu diplomové práce publikace autorů Ben Abdallah a kol. (2017), která je zasazená do skleníkových podmínek *in vivo*. Experiment trval 111 dní, rostliny měli autoři rozděleny do 3 skupin – 1. skupina (označena PP) byla prvních 21 dní vystavena nedostatku vody (vyvolá priming), poté skupina byla 60 dní pravidelně zalévána a 30 posledních dní nebyla zalévána vůbec; 2. skupina (NPP) byla pravidelně zalévána 81 dní a pouze posledních 30 dní nebyla zalévána vůbec; 3. skupina (C) byla kontrolní skupina, která byla pravidelně zalévána celých 111 dní. Mezi nejdůležitější závěry studie patří prokázaný pozitivní efekt primingu, který autoři spojují s vyšším obsahem prolinu a akumulací sacharidů, akumulace vede k lepší schopnosti rostlin zadržet vodu

v buňkách a vede k aklimaci rostlin. Autoři této práce však stanovovali jen celkový obsah rozpustných sacharidů, informace o změnách ve spektru, které nastávají při vystavení olivovníku takovým podmínkám, bohužel práce nenabízí. Mezi překvapivé zjištění práce patří, že olivovníky jsou zřejmě schopné udržet informaci o prodělaném stresu po velmi dlouhou dobu (60 dní). PP rostliny v studii Ben Abdallah a kol. (2017) vykazovaly vyšší přírůstky sušiny v porovnání s NPP rostlinami. U PP rostlin došlo také k signifikantnímu navýšení karotenoidů vůči NPP po znovuzalití (z 0.08 na 0.10 mg/g FW), stejně zvýšený obsah karotenoidů měly PP rostliny i po druhém stresovém působení. Celkový obsah polyfenolických látek se během primingu a znovuzalití neměnil, signifikantně se zvýšil až na konci experimentu u PP vůči NPP a C. Autoři Ben Abdallah a kol. (2017) také u rostlin měřili aktivitu tří antioxidačních enzymů – katalasy, superoxiddismutasy a guaiakolperoxidasy. Aktivita všech tří enzymů na konci experimentu u PP rostlin byla signifikantně vyšší v porovnání s NPP rostlinami. Aktivita GPOX u PP rostlin byla během primingu téměř dvojnásobná v porovnání s druhým stresovým působením. Zvýšená aktivita GPOX během prvního působení je v souladu s pozorováním již zmíněné práce autorů Silvestry a kol. (2017) výše, kteří rostliny vystavovali působení PEG jen jednou. NPP rostliny na konci experimentu v porovnání s kontrolou signifikantně navýšily aktivitu CAT a SOD, u GPOX došlo naopak k signifikantnímu snížení aktivity. Snížení aktivity v tomto případě je velmi zvláštní, jelikož pro NPP rostliny to bylo první působení a odporuje výše zmíněnému. Zřejmě záleží na síle a délce stresového stimulu a stáří rostliny, podle toho dochází k rozdílnému zapojení jednotlivých enzymů. Měření míry uniku elektrolytů odhalilo, že předchozí stresové působení umožňuje PP rostlinám zachovat míru úniku během druhého stresového působení na signifikantně nižší úrovni (cca 30 %) než NPP rostliny (cca 80 %), dokonce i na signifikantně nižší úrovni, než měly kontrolní rostliny (cca 40 %).

Také autoři Yamani a kol. (2019) popisují nárůst obsahu prolinu a rozpustných sacharidů v listech po jednorázovém, avšak dlouhodobém vystavení (12 dní) mladých rostlin *Olea europaea* nedostatku vody a tato práce tak je v souladu s pozorováním předchozích autorů. Bližší pohled na jednotlivé spektrum metabolizovaných sacharidů během stresu však práce neposkytuje.

2.2.2 Olivovník a zasolení

Olivovníky jsou často pěstovány v oblastech s nedostatečnými srážkami, navíc podzemní zdroje sladké vody jsou v oblasti Mediteránu často omezené, a tak je častou praxí zalívka slanou vodou (Fernández-Escobar, 2019). Mezi nejčastější příznaky stresu ze zasolení u olivovníku patří snížení růstu, zasychání vzrostných vrcholů, listové chlorózy, svinování listů, nekrózy kořenů a při velmi vysokém zatížení dochází i k opadu listů (Gucci a Tattini, 2010).

Odolnost u olivovníku vůči zasolení je spojená s mechanismem vylučování Na^+ a Cl^- iontů kořeny nebo jejich retencí v kořenech (Gucci a Tattini, 2010), tyto mechanismy snižují následnou translokaci Na^+ a Cl^- do nadzemních částí (Melgar a kol., 2007). Ukazuje se, že přidání Ca^{2+} do zálivky pomáhá snižovat koncentraci Na^+ v listech (Melgar a kol., 2006), vápenaté kationty tak zřejmě hrají důležitou roli ve vylučovacím mechanismu Na^+ (Melgar a kol., 2007). Odolnost vůči zasolení je však různorodá napříč jednotlivými genotypy (Gucci a Tattini, 2010). Mezi odolnější kultivary se řadí „Picual“ (Marin a kol., 1995), který je využíván v této diplomové práci.

Tietel a kol. (2019) popisují vliv zasolení na množství a kvalitu olivového oleje. Se zvyšujícím se zasolením došlo ke snížení obsahu oleje v plodech a negativně byla také ovlivněna kvalita oleje z hlediska optimálního složení mastných kyselin, dochází ke snížení obsahu kyseliny palmitoolejové (16:1) a alfa-linolenové (18:3). Stejní autoři však popisují, že olej získaný z plodů rostlin pod stresem ze zasolení obsahuje větší množství prospěšných polyfenolických látek. Dokonce existuje navržený mechanismus, jak v případě olivovníku dochází ke zvýšení obsahu polyfenolů. Autoři Ben Ahmed a kol. (2009) předpokládají, že zasolení vede k postupnému prohlubování nedostupnosti vody, které se ukazuje být klíčové pro aktivaci enzymu fenylalaninamoniumlyasa (PAL), klíčového enzymu v biosyntéze polyfenolů.

Již poměrně stará práce Tattini a kol. (1996) nabízí základní pohled na sacharidový metabolismus olivovníku, v práci autoři popisují hromadění manitolu a glukosy pod vlivem zasolení (100 mM a 200mM NaCl). K podobným závěrům dochází například i práce Chartzoulakis a kol. (2006), kde autoři popisují signifikantní navýšení obsahu manitolu v sušině (o 41 %) pod vlivem zasolení (150mM NaCl) v porovnání s kontrolou u kultivaru „Mastoidis“, obsah glukosy se také navýšil, a to bezmála o 12 %. Ben Ahmed a kol. (2008) popisují nárůst všech rozpustných sacharidů v listech jako reakci na stres ze zasolení, detailnější pohled na sacharidové spektrum však práce neobjasňuje. Petridis a kol. (2012) navrhuji, že existuje úzký vztah mezi hladinami glukosy a oleuropeinu v listech. Oleuropein je jedna z nejvíce zastoupených fenolických látek vyskytující se u olivovníku v listech a plodech (Cifá a kol., 2018). Tato látka je zodpovědná za hořkost olejů, které se z plodů lisují a jsou ji připisovány také značné farmakologické benefity na lidské zdraví (Omar, 2010). Ve své práci Petridis a kol. (2012) pozorovali akumulaci oleuropeinu v listech u 4 variet kulturního olivovníku, průměrný obsah oleuropeinu u všech variet při vystavení 125 mM NaCl v pravidelné zálivce byl přibližně 120 mg/g DW, kontroly měly průměrný obsah oleuropeinu nejvýše 40 mg/g DW. Stejní autoři pozorovali snížení obsahu glukosy v listech při vystavení 125 mM NaCl (průměrně 40 mg/g DW) v porovnání s kontrolou (průměrně 80 mg/g DW).

Autoři diskutují úzký vztah mezi hladinou glukosy a oleuropeinu v listech, kdy při nejsilnějším působení obsah oleuropeinu narůstá, zatímco obsah glukosy se snižuje. Autoři to vysvětlují tím, že oleuropein může sloužit jako glukózový rezervoár. Zmíněný oleuropein je u olivovníku jednou z nejvíce zastoupených fenolických látek, mladé plody mohou obsahovat až 14 % oleuropeinů v sušině (Omar, 2010). Petridis a kol. (2012) popisuje, že akumulace oleuropeinu je společná odpověď olivovníku na působení široké škály různých stresových faktorů. Ortega-García a Peragón (2009) zmiňují, že zvýšená akumulace oleuropeinu může poskytovat podobnou ochranu před poškozením dehydratací jako akumulace jiných kompatibilních solutů.

Regni a kol. (2019) popsali u 4 kultivarů olivovníku vystavených 100 a 200 mM NaCl navýšení aktivity dvou antioxidačních enzymů – CAT a glutathionreduktasy. Stejní autoři také pozorovali signifikantní snížení obsahu prolinu v listech v porovnání s kontrolou. Zajímavé je, že obsah prolinu nekoreloval s trváním experimentu, takže například rostliny jednoho kultivaru ošetřované 100mM NaCl měly přibližně stejný obsah prolinu po 180 dnech i po 240 dnech od začátku experimentu. Autoři Ahmed a kol. (2008) však v podobném experimentu, kde bylo použito také ošetření 100mM a 200mM NaCl po dobu 11 měsíců, pozorovali signifikantní navýšení obsahu prolinu vůči kontrole. Obsah prolinu při nejsilnějším ošetření dosahoval průměrně 2,63 $\mu\text{mol/mg FW}$, kontrolní rostliny obsahovaly průměrně 0,63 $\mu\text{mol/mg FW}$. Rozdílná reakce hladin prolinu u posledních dvou týmů může být způsobena použitím jiného kultivaru, různým stářím rostlin, dobou trvání experimentu a také odlišnou detekční metodou pro stanovení hladiny prolinu. Zdá se tak, že reakce prolinu není způsobena jen samotným působením stresového faktoru (v tomto případě zasolení) a má na ní vliv působení více faktorů.

2.2.3 Olivovník a působení suboptimálních teplot

Olivovník, stejně jako mnoho dřevin z podobných klimatických podmínek, patří mezi stálezelené stromy. Širšímu pěstování brání neschopnost přežít teploty klesající pod $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Larcher, 2000). Stejný autor také píše o značném poškození listů již při teplotách $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na druhou stranu Orlandi a kol. (2004) zmiňují fyziologický požadavek nízkých chladových teplot u olivovníku, tyto nízké teploty jsou v určité fázi vývoje nezbytné pro prolomení dormance květních pupenů.

Sanzani a kol. (2012) ve svém review přehledně rozdělují chladový stres do dvou skupin podle teploty na: chladové působení ($15\text{ }^{\circ}\text{C} - 0\text{ }^{\circ}\text{C}$) a mrazové působení (teploty nižší než $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ doprovázené tvorbou ledu). Mrazové působení dále rozdělují na: rané mrazy (během podzimu), zimní mrazy (mrazy během zimního klidového období) a pozdní mrazy (na jaře, během prorůstání pupenů). Během celého vegetačního cyklu se pochopitelně mění i citlivost olivovníku vůči těmto teplotám. Zajímavá je také různá citlivost různých rostlinných orgánů.

Mezi nejvíce nápadné projevy poškození mrazem patří poškození špiček vzrostných vrcholů, chloróza listů či dokonce jejich opad, oddělování kůry na dřevnatých částech a také poškození plodů (Barranco a kol., 2005).

Experimenty *in vivo*

Barranca a kol. (2005) provedli porovnání odolnosti vůči mrazu u několika kultivarů *Olea europaea*. Mezi nejvíce odolnými kultivary v této studii byl i kultivar Picual, se kterým jsem pracoval i já. Porovnání odolnosti olivovníků v této studii bylo založeno na měření elektrické konduktivity roztoku, do které se uvolnily ionty z mrazem poškozených buněk. Mrazové teploty totiž mohou vést k formování ledu uvnitř buněk, což může vést k poškození membrán a v konečném důsledku až k smrti buňky. Na sledování poškození buněk vlivem mrazu u *Olea europaea* byla zaměřená i práce Moshtaghi a kol. (2009). Zde se zaměřili na 7 kultivarů zmíněného druhu *Olea europaea*. Odebrané vzorky listů podrobili teplotám klesajícím až na -20 °C, následně byly ponechány 24 hodin inkubovat v destilované vodě, a nakonec byla změřena konduktivita vody, do které se za tu dobu uvolnily ionty. Popsaná metoda sice spolehlivě určí odolnost daného genotypu vůči chladu příp. mrazu (respektive míru poškození plazmatické membrány), nicméně chladová odolnost jako taková je komplexní jev a pouhé popsání míry poškození membrán nám pro objasnění mechanismu odolnosti nestačí.

Olivovník se dokáže se aklimovat na nízké teploty během zimního období. Samotná aklimace na nízké teploty závisí na kooperaci několika endogenních stimulů a environmentálních parametrů, mezi které hlavně patří teploty nižší než 5 °C a zkracující se fotoperioda (Heino a Palva, 2004 podle Sanzani a kol., 2012). Také nezávislé vystavení jiných dřevin zkracující se fotoperiodě nebo nízkým teplotám může také vést k vytvoření určité mrazové tolerance (Welling a kol., 2002). Chladová aklimace u olivovníku je spojena se zvýšenou aktivitou enzymatického antioxidačního systému, Cansev a kol. (2009) popisují zvýšenou aktivitu CAT, APX a NADPHoxidasy. K podobnému zjištění došli ve své práci i Saadati a kol. (2020), kteří u několika kultivarů chladově aklimatizovaných olivovníků uprostřed zimního období změřili zvýšenou aktivitu APX, CAT, SOD a POD, k největšímu zvýšení aktivity došlo u chladově tolerantního kultivaru Amphisis. Stejní autoři také měřili obsah prolinu v listech, ten dosahoval u kultivaru Amphisis uprostřed zimního období průměrně až 8 µmol/mg FW, což je asi dvojnásobek proti chladově citlivému kultivaru Manzanilla ve stejné době. Autoři ve své práci dochází k závěru, že sledování aktivity antioxidačních enzymů a obsah prolinu v listech může být signifikantním kritériem pro hledání chladově tolerantních kultivarů u olivovníku.

Autoři di Ortega-García a Peragón (2009) popisují navýšení obsahu oleuropeinu při působení suboptimálních teplot u kultivaru Picual, obsah v listech při nejsilnějším působení dosahoval průměrně 22 g/kg DW. Gulen a kol. (2009) sledovali hladiny fosfolipidů a rozpustných sacharidů u plně aklimatizovaných olivovníků (SA) uprostřed zimního období a u neaklimatizovaných olivovníků (NA) uprostřed letního období. Mezi překvapivé výsledky patří, že celkový obsah všech rozpustných sacharidů v listech byl vyšší u skupiny SA, pohled na spektrum sacharidů práce nepřináší. Celkový obsah sacharidů v listech koreloval s odolností jednotlivých sledovaných kultivarů a je tak v souladu s pozorováními jiných autorů (Galiba a kol., 1997; Sasaki a kol., 1998). Gucci a kol. (2003) (podle Sanzani a kol., 2012) pozorováním zjistili, že mrazově aklimatizované olivovníky mohou snadno tuto aklimaci ztratit, a to v případě, pokud průměrné zimní teploty překročí 16 °C alespoň po dobu 6 dní.

Experimenty *in vitro*

Možnost detailněji studovat jednotlivé mechanismy odolnosti a přežívání nám dovolují experimenty *in vitro*. Jedním takovým je i práce Bartolozzi a kol. (2001), která sleduje vliv mrazové aklimace na přežívání rostlin v podmínkách *in vitro*. Rostliny (jednotlivé výhony se třemi nody) po přenesení do média nejprve autoři ponechali 14 dní zvyknout na nové podmínky, poté část rostlin přenesli do aklimatizačních podmínek, které byly následující: 4 °C, 16 h fotoperioda a 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (studené bílé světlo). Zde je ponechali dalších 14 dní. Jako další krok bylo přenesení těchto aklimatizovaných rostlin spolu s neaklimatizovanou kontrolní variantou do podmínek, kde teploty postupně (o 2 °C/h) klesly až k -20 °C. Bartolozzi a kol. (2001) popisují, že skupina aklimatizovaných oliv přežívala lépe a vykazovala menší známky poškození než skupina neaklimatizovaných. Skupina aklimatizovaných jevila známky poškození při -15 °C, zatímco skupina neaklimatizovaných jevila známky poškození již při -10 °C. Práce Bartolozzi a kol. (2001) také popisuje vliv koncentrace sacharosy v médiu na přežívání rostlin vystavených mrazovým teplotám v podmínkách *in vitro*. Práce bohužel neposkytuje vhled do změn sacharidového metabolismu v samotných rostlinách. Rejšková a kol. již v roce 2007 tento vhled na změny sacharidového metabolismu alespoň částečně poskytují, pracovali se stejným kultivarem olivy, jako pracuji já. Materiál podrobili chladovému působení 4 °C nebo 0 °C a sledovali změny hladin endogenních rozpustných sacharidů. Chladové působení v její práci způsobilo celkové navýšení endogenních sacharidů vůči kontrole. V jejich práci došlo k mírnému zvýšení obsahu RFO a manitolu u všech chladových ošetření, avšak nedošlo k žádné velké změně v poměrném zastoupení jednotlivých sledovaných rozpustných sacharidů.

2.3 Stresová paměť

Fleta-Soriano a Munné-Bosh (2016) definují stresovou paměť jako soubor strukturních, biochemických a genetických modifikací vyplývajících z působení stresového faktoru, které umožňují rostlinám uchovat informaci o prodělané stresové události, tato paměť může rostlinám zlepšit odolnost a adaptaci vůči stresovým epizodám v budoucnu. Lämke a Bäurle (2017) zmiňují, že tuto informaci dokážou rostliny uchovat od několika hodin až po několik dní nebo dokonce celý život. Pokud je stresová paměť takto omezena na jednu generaci, hovoříme o tzv. somatické stresové paměti (Lämke a Bäurle, 2017). Pokud je paměťový efekt detekovatelný u první generace, která působení stresového faktoru již nezažila, hovoříme o tzv. mezigenerační stresové paměti (Lämke a Bäurle, 2017). Transgenerační stresová paměť je pak paměťový efekt detekovatelný nejméně po dvou generacích, které nezažily působení stresového faktoru (Lämke a Bäurle, 2017). Tzv. křížová stresová paměť je označení pro stresovou paměť pro jeden stresový faktor, který ovšem rostlině poskytuje ochranu před poškozením jinými stresovými faktory (Blodner a kol., 2005).

Nikiforou a Manetas (2017) popsali fenomén tzv. ekologické stresové paměti, jedním ze zkoumaných druhů je právě i *Olea europaea*. U tohoto druhu sledovali flukтуаční asymetrii listu (absolutní hodnota rozdílu délek pravé a levé strany od střední žilky vydělená celou listovou plochou) a základní parametry fotosyntézy a našli mezi těmito dvěma proměnnými korelaci, kterou pokládají za ekologickou formu stresové paměti. Autoři dále diskutují, že stresové působení se projevuje na mladých listech, které následkem stresu změní svou symetrii a list si tak nese tuto „stopu stresu“ po celý život jako známku prodělaného stresu. Trabelsi a kol. (2019) pak shrnují, že olivovník dokáže sice přežít silný nedostatek vody, ovšem není schopný plného zotavení po znovuzalítí. Trabelsi a kol. (2019) popisují, že mladé listy olivovníku ztrácí svoji fyziologickou kapacitu v limitujícím prostředí, a to díky vytváření fyziologických a strukturních adaptací na úrovni listu s cílem zamezit ztrátám vody. Vytváření těchto adaptací vede k permanentnímu poškození listové aktivity z hlediska fotosyntézy, autoři zmiňují trvalé snížení fotosyntetické aktivity vlivem sucha až 45 %. O konkrétnějších permanentních dopadech a adaptacích v souvislosti s nedostatkem vody však práce mlčí.

Lukič a kol. (2020) ve své práci popisují zapojení antioxidantních enzymů do dlouhodobé somatické stresové paměti vůči stresu z nedostatku vody. Jak je již výše v jednotlivých částech literárního úvodu popsáno, priming a stresová paměť mohou být úzce spojeny s dynamickou antioxidantní ochranou, která rostlinám poskytuje ochranu před negativním působením ROS jako důsledek působení opakovaných stresových stimulů. Výše jsou popsány úzce zaměřené práce, kde antioxidantní ochrana stojí v centru mechanismů

olivovníku v boji proti stresu. Jednoznačné hodnocení příspěvku antioxidační systému k obranným reakcím je komplikováno jednak jeho multifunkčností, ale i proměnlivostí detailnosti jednotlivých studií. V našem zájmu sledované sacharidy jsou toho výborným příkladem. Pro rostlinu jsou důležitým zdrojem uhlíku a energie, dále mohou sloužit jako osmotikum, jsou důležitou signální molekulou a také existují práce popisující jejich schopnost pohotově zhaset reaktivní formy kyslíku. Nabízí se tedy otázka, zdali některá ze zmíněných složek může mít paměťový efekt. V této diplomové práci jsou sledovány hlavně odpovědi neenzymatického antioxidačního systému (převážně sacharidů) na opakovaný chladový stres u dvou forem olivovníku (kulturní a planá) a klade si za cíl zjistit, do jaké míry je antioxidační systém zapojený do stresové paměti u olivovníku. Práce si také klade za cíl porovnat odpovědi kulturní a plané formy olivovníku. Částečně jsou sledovány reakce na opakovaný stres ze zasolení a z nedostatku vody.

3 Materiál a metody

3.1 Rostlinný materiál

Jako rostlinný materiál byly používány dva genotypy olivovníku: *Olea europaea* L. cv. Picual jako zástupce kulturně pěstovaného olivovníku a *Olea europaea* subsp. *laperrinei* jako jeden z planých forem rostoucích olivovníků.

3.1.1 Původ rostlinného materiálu

Kulturní genotyp olivovníku *Olea europaea* cv. Picual byl k dispozici při nástupu do magisterského studia již v kultuře *in vitro*, která byla zavedena v rámci vypracování diplomové práce Mgr. Alžběty Rejškové a poté udržována ve sbírkách rostlin na pracovišti Katedry experimentální biologie rostlin. Přírodovědecké fakulty UK. Přesný postup odvození viz. Rejšková a kol. (2007). Rostliny z udržovací sbírky jsem si namnožil a dále udržoval na standartním udržovacím médiu, jehož příprava bude popsána níže.

Divoký genotyp olivovníku *Olea europaea* subsp. *laperrinei* jsem taktéž dostal k dispozici již zavedený do kultury *in vitro* při nástupu do studia. Kultury byly odvozené z dřevnatých výhonů odebraných v rámci spolupráce mezi Botanickou zahradou Univerzity Karlovy a Botanickou zahradou v Alžíru (Jardin d'Essai du Hamma), které pro naše pracoviště zprostředkovalo v roce 2014 Velvyslanectví České republiky v Alžíru. Tyto kultury zavedla a odvozovala moje školitelka RNDr. Hana Konrádová.

3.1.2 Kultivační postupy

Kultivace veškerého rostlinného materiálu popsaného v této práci byla prováděna na Katedře experimentální biologie rostlin Přírodovědecké fakulty UK. Kultury *in vitro* byly pěstovány v Erlenmayerových baňkách o objemu 100ml. Každá baňka obsahovala cca 25 ml kultivačního média. Tyto baňky byly kryty dvojitou vrstvou alobalové folie (není-li uvedeno jinak). Při pasážování byly do jednotlivých baněk většinou umísťovány 3-4 nodální segmenty, které byly do média zapíchnuty tak, aby se axilární pupeny nacházely nad úrovní média. Obvyklý subkultivační interval byl u udržovacích kultur cca 8-10 týdnů v závislosti na aktuálním stavu materiálu.

3.1.2.1 Podmínky kultivačního boxu č. 1 („udržovací box“)

V boxu byla nastavena fotoperioda 18/6. Fotosynteticky aktivní ozáření 1. police (pro kulturní genotyp olivovníku) byla cca 234 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Fotosynteticky aktivní ozáření 2. police (pro divoký genotyp olivovníku) byla cca 73 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Ozáření byla měřena vždy v úrovni kultivačního média jednotlivých baněk. Kultivační teplota v boxu byla 25 ± 1 °C.

3.1.2.2 Podmínky kultivačního boxu č. 2 („box pro chladové experimenty“)

V boxu (FitoClima 600 PLH, Aralab) byla nastavena fotoperioda 18/6. Ozářenost 1. police (pro kulturní genotyp olivovníku) byla cca 252 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ PAR. Ozářenost 2. police (pro divoký genotyp olivovníku) byla cca 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ PAR. Ozářenost bylo měřena vždy v úrovni kultivačního média jednotlivých baněk. Standardní kultivační teplota byla 22 ± 1 °C. Box byl převáděn podle schématu chladových experimentů na teploty nejprve 12 °C a poté 6 °C (viz 3.3.3 Přehled experimentů)

3.1.3 Standartní udržovací média

Jako standartní udržovací médium pro rostlinný materiál bylo použito modifikované pevné MS médium (Murashige a Skoog, 1962) s polovičním obsahem makro- i mikroprvků, které bylo vždy připravováno ze zásobních roztoků, které jsem si sám míchal. Zásobní roztoky byly připravovány podle tabulky č.1. Zásobní roztoky A, B, a C byly uchovávány v lednici při teplotě 4 °C. Jelikož docházelo k častým kontaminacím zásobního roztoku D, tento roztok byl po namíchání rozpipetován do menších plastových nádobek, zamražen, uchováván při teplotě -4 °C a před každým použitím byl individuálně rozmražen a přidán k médiu. Na 1 l udržovacího média bylo použito různé množství roztoku A, B, C a D (viz tabulka č.2).

Do média byly přidávány také další modifikující složky a hormony, které jsou uvedeny v tabulce č.3. Do standartního udržovacího média se přidávaly ještě sacharidy, a to konkrétně směs sacharosy a manitolu, každý z nich v množství 15 g/l média.

Celkový objem média byl odměřen v kalibrovaném odměrném válci a doplněn dH₂O na cílový objem. Poté se upravilo pH (Orion 410 A+), konečné pH média by mělo být vždy 6.00, pokud pH při měření bylo jiné, upravilo se pomocí 0.2M nebo 1M roztoku KOH, případně pomocí 0.2M roztoku HCl. Jako poslední složka bylo přidáno 7 g/l práškového agaru (Sigma-Aldrich, plant cell culture tested), který se rozmíchal v médiu. Médium se poté rozvařilo v mikrovlnné troubě, rozlilo do kultivačních nádob a nádoby uzavřely alobalovou fólií. Veškerá použitá kultivační média byla sterilizována po dobu 20 minut v automatickém klávu (teplota 121 °C, tlak 0,144 MPa).

Zásobní roztok	Komponenty zásobního roztoku	Koncentrace v zásobním roztoku v g/l	Koncentrace v médiu mg/l
A	Dusičnan draselný (KNO ₃)	38	0,95
	Dihydrogenfosforečnan draselný (KH ₂ PO ₄)	3,4	0,085
	Dusičnan amonný (NH ₄ NO ₃)	33	0,825
	Síran hořečnatý heptahydrát (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	7,4	0,185
	Chlorid vápenatý dihydrát (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	8,8	0,166
B	Síran manganatý tetrahydrát (MnSO ₄ ·4H ₂ O)	3,38	8,45
	Síran zinečnatý heptahydrát (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	1,72	4,3
	Kyselina boritá (H ₃ BO ₃)	1,24	3,1
	Jodid draselný (KI)	0,166	0,415
	Molybdenan sodný dihydrát (Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O)	0,05	0,125
	Síran měďnatý pentahydrát (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0,005	0,0125
	Chlorid kobaltnatý hexahydrát (CoCl ₂ ·6H ₂ O)	0,0026	0,0065
C	Síran železnatý heptahydrát (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	5,56	27,8
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	7,46	37,3
D	Myo-inositol	20	100
	Kyselina nikotinová	0,1	0,5
	Pyridoxin – HCl	0,1	0,5
	Thiamin – HCl	0,1	0,5
	Glycin	0,4	2

Tabulka č.1: Složky zásobních roztoků a koncentrace jednotlivých složek

Složka	Množství na 1 l média
A	25 ml
B	2,5 ml
C	5 ml
D	5 ml

Tabulka č.2: Základní složky média

Další složky standartního udržovacího média			
<i>Olea europaea</i> cv. Picual		<i>Olea europaea</i> subsp. <i>laperrinei</i>	
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	600 mg/l	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	600 mg/l
kyselina gibberelová (GA ₃)	7 mg/l	kyselina gibberelová (GA ₃)	4 mg/l
L-glutamin	1 g/l	L-glutamin	1 g/l
trans-zeatin	4 mg/l	trans-zeatin	2 mg/l

Tabulka č.3: Koncentrace dalších složek přidávaných do standartního udržovacího média

3.1.3.1 Práce v aseptickém prostředí

Pasážování kultur bylo prováděno v laminárním flowboxu, který poskytuje aseptické prostředí vhodné pro tento typ práce s kulturami *in vitro*. Všechny nástroje i Petriho misky pro manipulaci s kulturami byly před každým novým použitím sterilizovány v horkovzdušné sušárně. V průběhu práce se nástroje opakovaně dezinfikovaly ponořením do 70% ethanolu a následným opálením v plameni.

3.1.3.2 Výroba polopropustných víček

Nejprve byla nastříhaná průhledná PP fólie na čtverce o hraně cca 10 cm. Pomocí korkovrtu byly doprostřed vyvrtány dva otvory o průměru 1 cm. Přes ně byly přelepeny polopropustné filtry Suncap (Sigma-Aldrich) s póry o vel. 0,04 μm . Připravená víčka byla poté hromadně sterilizována autoklávováním v Petriho miskách většího průměru, kde byla oddělena namočeným filtračním papírem. Na baňky s právě nasazenými segmenty byla víčka upevněna pomocí pruženky.

3.1.4 Experimentální ošetření materiálu

3.1.4.1 Experimentální média

Experimentální kultivační média byla připravována stejně jako je popsáno výše s následujícími modifikacemi (viz 3.3.3 Přehled experimentů):

- pro experimenty s *O. europaea* cv. Picual byla používána sacharosa jako zdroj uhlíku v médiu (s výjimkou experimentů PRIMUS 2 a 3), a to v množství 10 g/l média
- pro experimenty s *O. e. subsp. laperrinei* byla používána sacharosa jako zdroj sacharidů v médiu, a to v množství 30 g/l média
- pro simulaci nedostatku vody byl do média přidán PEG 4000 nebo PEG 6000 o koncentraci 0 %, 2 % nebo 4 % (0, 20 g/l či 40 g/l)
- pro navození zasolení byl do média přidán chlorid sodný o koncentraci 50 či 100 mM (2,9 g/l či 5,8 g/l)

3.1.4.2 Chladové působení

Rostliny byly pěstovány na experimentálním médiu po dobu cca prvních 45 dní v udržovacím boxu. Poté byly postupně přenášeny do boxu pro chladové experimenty podle designu experimentu (viz 3.3.2.2 Design C), kde byla teplota změněna nejdříve na 12 °C na dobu 4 dní, poté byl box převeden na 22 °C na 3 dny a nakonec na 6 °C na dobu 4 dní. Poté začala fáze recovery, kdy byl box převeden zpět na 22 °C na dobu cca 45 dní. Kontrolní skupina rostlin byla po celou dobu experimentu udržována v udržovacím boxu a nebyla přenášena.

3.2 Metodiky měření

3.2.1 Měření růstových charakteristik

Měření růstových charakteristik bylo zaměřeno na sledování přírůstků čerstvé hmoty jak kalusu, tak i výhonů, které vyrostly z jednotlivých nodálních segmentů. Každá rostlina byla opatrně vyjmuta z baňky, výhon byl skalpelem oddělen od původního nodu, který dal vzniknout rostlině a od kalusu vzniklého na bázi primárního explantátu. Nadzemní část a kalus byly zvlášť zváženy na analytických vahách s přesností na 3 desetinná místa. Pokud z jednoho zasazeného segmentu prorostly oba úžlabní výhony, přírůstek se počítal jako součet jejich hmotnosti.

3.2.2 Odebírání vzorků a jejich následné uchovávání

Vzorky byly odebírány vždy ihned po vyjmutí rostliny z kultivační nádoby. Pomocí skalpelu byla oddělena kalusová část na bázi výhonu a byla použita buď celá přirostlá nadzemní část, vytvořená z primárního explantátu, anebo pomocí dvou pinzet byly odebrány jen plně vyvinuté listy (viz dále popis jednotlivých analytických metod). Veškerý rostlinný materiál byl okamžitě po odebrání (či zvážení, viz níže) vložen do dvakrát propíchnuté mikrozkušavky, která byla následně ponořena do tekutého dusíku. Vzorky byly následně zpracovány příslušnou metodikou, anebo uloženy do mrazáku, kde byly skladovány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3 Stanovení obsahu nestrukturních sacharidů

Vzorky pro měření nestrukturních sacharidů byly odebírány vždy v rozmezí 50-200 mg čerstvé hmotnosti do 1,5 ml propíchnutých a zvážených mikrozkušavek. Odebrány byly buď celé přirostlé výhony anebo jen listy z těchto výhonů. Tyto vzorky se ihned po připravení a zvážení umístily do tekutého dusíku. Poté se vzorky uchovávaly v mrazícím boxu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do lyofilizace (sušení cca 10-20 hodin za sníženého tlaku). Po vyjmutí z lyofilizátoru byly vzorky ihned zváženy a poté byly přemístěny do exsikátoru do dalšího zpracování.

Ke každému vzorku bylo přidáno 0,5 ml 80 % metanolu, vzorky byly umístěny do vyhřátého termobločku nastaveného na $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ a zde byly ponechány 15 minut. Následně byly vzorky přemístěny do přístroje Speedvac Plus SC110A, Savant, aby se ze vzorků odpařil metanol (program V-AL, teplota $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 hodiny). Pro extrakci rozpustných sacharidů bylo přidáno podle hmotnosti sušiny vzorků příslušné množství demineralizované ultračisté (mili-Q) vody, viz tabulka č.4. Vzorky byly následně umístěny do ultrazvukové lázně na plovoucí raft tak, aby se nedotýkaly dna, a zde byly sonifikovány 15 minut. Následovala cetrifugace na 10 minut (Eppendorf Centrifuge 5415D při 16 000 rcf)). Posléze byl supernatant pomocí injekční stříkačky filtrován přes membránové filtry (Millex Millipore, velikost pórů filtrů $0,45\text{ }\mu\text{m}$) do nové označené mikrozkušavky. Mezi jednotlivými vzorky byla stříkačka dvakrát propláchnuta

miliQ vodou. Hotové vzorky byly před měřením uchovávány při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro stanovení rozpustných endogenních sacharidů bylo využito vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Parametry měření byly následující: Teplota kolony $80\text{ }^{\circ}\text{C}$; průtoková rychlost $0,5\text{ ml/min}$; mobilní fáze - MiliQ H_2O ; kolona Shodex Ca^{2+} (SC1011) s příslušnou předkolonou; isokratická pumpa Delta Chrom SDS 030; refraktometrická detekce (Shodex RI-101); software CLARITY. Sacharidy byly identifikovány na základě srovnání retenčních času vzorků s příslušnými standarty (Sigma-Aldrich). Zóna RFO označuje oblast chromatogramů, kde se nacházejí rafinosa, stachyosa a verbaskosa. Jednotlivé vzorky byly poté přepočítány na hmotnost sušiny listu podle vzorce:

$$\text{Množství sacharidů v sušině} = S_x / S_s * V_{\text{H}_2\text{O}} / \text{DW} [\mu\text{g/mg}]$$

Kde: S_x je plocha peaku konkrétního sacharidu v chromatogramu příslušného vzorku

S_s je plocha peaku příslušného standartu sacharidu

$V_{\text{H}_2\text{O}}$ je objem MiliQ H_2O přidané ke vzorku

DW je hmotnost suchého vzorku

Suchá hmotnost vzorku [mg]	MiliQ voda [ml]
< 5	0,2
5–10	0,3
10–20	0,5
20–30	1
30–40	1,5
40–50	2

Tabulka č.4: Množství MiliQ vody přidávané podle suché hmotnosti vzorku

3.2.4 Stanovení obsahu askorbátu

Stanovení obsahu (redukované) kyseliny askorbové ve vzorcích z odebraných listů kulturního olivovníku bylo prováděno pomocí komerčně dodávaného kitu (Ascorbic Acid Assay Kit II-Sigma-Aldrich). Tato metodika byla pouze ve fázi optimalizace a dál bohužel nebyla z důvodu nízkých výtěžků využita. Detailní postup zpracování rostlinného materiálu, přípravy extraktů a metodika použití kitu je popsána v diplomové práci Mgr. Nikoly Štěpánové (Štěpánová 2020).

3.2.5 Stanovení míry úniku elektrolytů z pletiv

Míra úniku elektrolytů (EL) byla stanovována z čerstvých odebraných vzorků prýtu o známé navážce. Každý vzorek byl nejprve vložen do kádinky a opláchnut dH₂O (vzorek se ponechal malou chvíli v dH₂O, aby se vymyly elektrolyty vyplavené po odříznutí vzorku). Pak byl vzorek velmi opatrně přesunut do předem připravené a označené scintilační lahvičky s 15 ml dH₂O, kde byl ponechán louhovat ve tmě při pokojové teplotě 24 hodin. Poté bylo odpipetováno 7,5 ml výluhu do čisté centrifugační zkumavky. Sonda multimetru Edge HI2020 byla ponořena do roztoku ve zkumavce, poklepáním bylo docíleno uvolnění vzduchových bublin, které se mohou hromadit v sondě, následně bylo změřena hodnota EC₀. Poté byl zbylý roztok včetně prýtu dolit do zkumavky, zkumavka byla uzavřena víčkem, avšak ne úplně nadoraz. Vzorky byly umístěny do stojanu a vykládvány v autoklávu při standardním cyklu s pomalým vyrovnáváním tlaku. Vzorek byl po vychladnutí přelit do čisté nádoby. Odtud bylo odpipetováno 7,5 ml roztoku a byla změřena jeho konečná konduktivita (EC_{kon.}). Jednotlivé hodnoty EC₀ a EC_{kon} byly přepočítány na 0,1 g čerstvé hmotnosti. Výsledná míra úniku elektrolytů z celkového množství elektrolytů v pletivu byla stanovena podle vzorce (Si et al., 2019):

$$EL = (EC_0 / EC_{kon}) * 100 [\%]$$

Kde: EC₀ = množství elektrolytů uniklých z pletiv za stanovený čas

EC_{kon} = celkové množství elektrolytů v pletivech

3.2.6 Stanovení obsahu antokyanů

Vzorky pro měření absorbance antokyanů byly odebírány v rozmezí 50-200 mg čerstvé hmotnosti (listy) do 1,5 ml propíchnutých a zvážených mikrozkušavek. Tyto vzorky se ihned po přípravě a zvážení umístily do tekutého dusíku. Poté se vzorky uchovávaly v mrazáku při teplotě -80 °C až do lyofilizace (cca 10-20 hodin za sníženého tlaku), vzorky byly po vyjmutí z lyofilizátoru ihned zváženy. Následně bylo ke každému vzorku přidáno 1 ml okyseleného metanolu. Okyselený metanol byl připravován vždy před samotnou přípravou vzorků. Na 10 ml okyseleného metanolu bylo smícháno 9,8 ml metanolu a 0,2 ml kyseliny sírové (H₂SO₄), poté bylo ověřeno pH výsledného roztoku (pH 1). Vzorky s okyseleným metanolem se daly na 5 minut do vyhřátého termobločku na teplotu 70 °C. Poté byly vzorky přeneseny do lednice a zde se ponechaly 2 dny extrahovat. Supernatant byl napipetován do nových popsáných mikrozkušavek. 500 µl vzorku byla napipetováno do skleněné 1ml kyvety a byla změřena

absorbance (Evolution 201; software Thermo insight) A_{530} a A_{657} . Jako blank byl použit okyselený metanol.

Absorbance antokyanů v sušině byla spočtena pomocí vzorce:

$$A = [A_{530} - (0,25 * A_{657})] / DW$$

Kde: A_{530} je absorbance příslušného vzorku při vlnové délce 530 nm

A_{657} je absorbance příslušného vzorku při vlnové délce 657 nm

DW je hmotnost sušiny příslušného vzorku

3.2.7 Stanovení aktivity antioxidačních enzymů

3.2.7.1 Extrakce proteinů

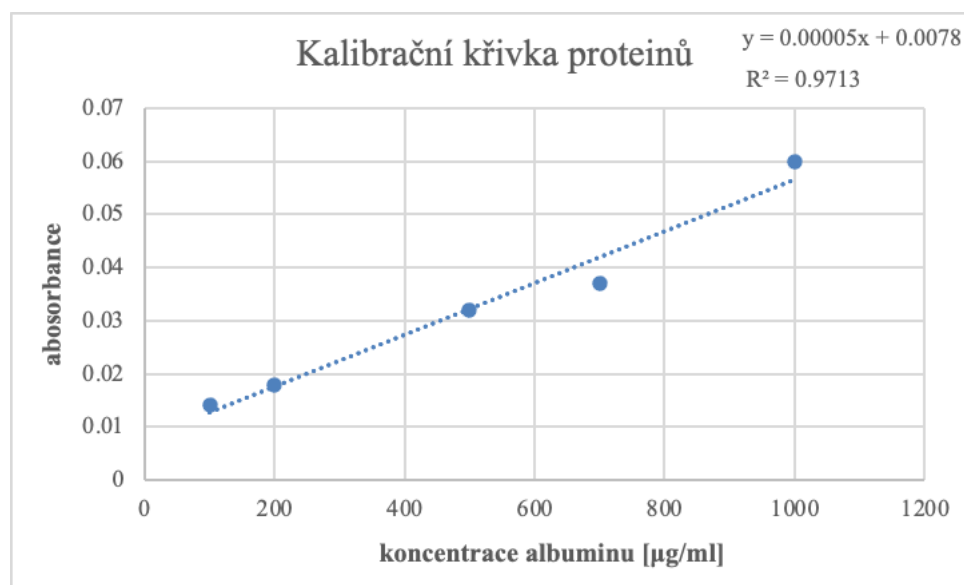
Rostlinný materiál byl nejprve v tekutém dusíku rozmělněn na prášek. Přibližně 3 g rozdrčeného materiálu bylo homogenizováno v 0,1M Tris/HCl pufru (složení pufru uvedeno v tabulce č.5), kde na 1 g sušiny bylo použito 10 ml pufru. Po celou dobu extrakce proteinů byl vzorek uchovávan buď na ledu (včetně míchání) nebo v chlazené centrifuze (4 °C). Roztok byl po dobu 30 minut míchán na míchačce. Poté byl nejprve centrifugován (27 000 rpm, po dobu 30 minut) a následně přefiltrován přes Miracloth Filter. Do supernatantu byl k vysrážení nežádoucích těžkých proteinů přidán síran amonný (40% nasycení). Homogenát byl opět 30 minut míchán a následně 30 minut centrifugován. Vzorky byly přefiltrovány přes Miracloth Filter. Do supernatantu byl přidán síran amonný (80% nasycení). Vzorek byl opět 30 minut míchán a následně 30 minut centrifugován. Pelet byl rozpuštěn ve 2,5 ml 25 mM Tris/HCl pufru (složení uvedeno v tabulce č.5) a převeden na PD 10 kolonu (Sephadex G-25 M, GE Healthcare). Byla provedena eluce 3,5 ml 25mM Tris/HCl pufrem. Vzorky byly poté zmrazeny a skladovány při -80 °C.

0,1 M Tris/HCl pufr	0,1 M Tris/HCl, 5 mM EDTA, 1 % PVP K30, 5 mM DTE, 1 % Nonidet P 40
25 mM Tris/HCl pufr	25 mM Tris/HCl

Tabulka č.5: Chemické složení pufrů pro extrakci proteinů

3.2.7.2 Stanovení obsahu proteinů

Množství proteinů ve vzorku bylo zjištěno pomocí Bradfordova testu (Bradford, 1976). Jedná se o fotometrickou metodu založenou na úměrném navázání barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 na protein. Vzorky byly měřeny na mikrodestičkách. Do jednotlivých jamek bylo pipetováno vždy 5 μl vzorku ve třech opakováních. Dále bylo ke vzorkům přidáno 250 μl pufru. Vzorky byly ponechány 10 minut a následně byla změřena absorbance vzorků P na spektrofotometrem CLARIOstar (BMG LABTECH) při 595 nm. Ke stanovení koncentrace proteinů v roztoku byla vytvořena kalibrační křivka proteinů (viz graf č.1). Jako standard byl použit albumin hovězího séra (BSA) v množství 100-1000 $\mu\text{g/ml}$.



Graf č.1: Kalibrační křivka pro stanovení obsahu proteinů ve vzorku

3.2.7.3 Stanovení enzymatické aktivity

V připravených extraktech byla stanovena aktivita vybraných třech enzymů, které se běžně využívají jako indikátory antioxidační aktivity, a to peroxidasa (POD), askorbátperoxidasa (APX) a katalasa (CAT). Sledovaným parametrem byla změna absorbance vzorku v závislosti na čase při pokojové teplotě po přidání specifického substrátu.

Aktivita POD byla stanovena použitím barevné reakce s použitím standartních substrátů guaiakol (Drotar et al. 1985). Aktivita CAT byla detekována pomocí spotřeby peroxidu vodíku (Verma a Dubey 2003). Aktivita APX byla detekována pomocí snížení absorbance askorbátu (Vanacker et al. 1998). Složení roztoků a substrátů pro stanovení specifické aktivity jednotlivých enzymů je shrnuto v tabulce č.6. V tabulce č.7 jsou popsány veličiny potřebné pro výpočet specifické aktivity enzymů.

enzym	reagencie	zásobní roztok	pipetovaný objem
APX	55,56 mM K ₂ HPO ₄ , pH 7	3,17 g/250ml dH ₂ O	36 ml
	60 mM askorbát sodný	0,01189 g/10ml dH ₂ O	10 µl
	3 % H ₂ O ₂	3 ml/30 ml d H ₂ O	41 µl
	směs pufr-substrát		180 µl
	extrakt enzymů		20 µl
CAT	100 mM K ₂ HPO ₄ , pH 7	5,7055 g/250 ml dH ₂ O	30 ml
	100 mM H ₂ O ₂	102 µl/5 ml dH ₂ O	12 ml
	směs pufr-substrát		140 µl
	extrakt enzymů		10 µl
POD	50 mM Tris/HCl, pH 6	1,5143 g/250 ml dH ₂ O	27 ml
	3,4 mM guaiakol	38 µl/100 ml dH ₂ O	600 µl
	9 mM H ₂ O ₂	0,9195 ml/l dH ₂ O	600 µl
	směs pufr-substrát		190 µl
	extrakt enzymů		10 µl

Tabulka č.6: Složení roztoků pro stanovení specifické aktivity askorbátperoxidasy, katalasy a peroxidasy

enzym	extinkční koeficient [mM/cm]	výška vzorku v jamce [mm]	vlnová délka [nm]
APX	2,8	5,94	290
CAT	0,036	4,63	240
PX	26,6	5,94	420

Tabulka č.7: Veličiny pro výpočet specifické aktivity askorbátperoxidasy, katalasy a peroxidasy

Specifická aktivita enzymů byla vypočítána podle následující rovnice:

$$\text{specifická aktivita} = \left\{ \left(\frac{\frac{\Delta A}{\Delta t_{\text{vzorku}}} - \frac{\Delta A}{\Delta t_{\text{blank}}} * V_{\text{celk.}}}{\varepsilon * d * V_{\text{vzorek}}} \right) * 1000 \right\} / C_{\text{Bradford}}$$

Kde: $\frac{\Delta A}{\Delta t_{vzorku}}$ je absorbance vzorku v čase
 $\frac{\Delta A}{\Delta t_{blank}}$ je absorbance blanku v čase
 $V_{celk.}$ je celkový objem kyvety
 ε je extinkční koeficient
 d je výška vzorku v kyvetě
 V_{vzorek} je objem pipetovaného vzorku
 $C_{Bradford}$ je obsah proteinu ve vzorku

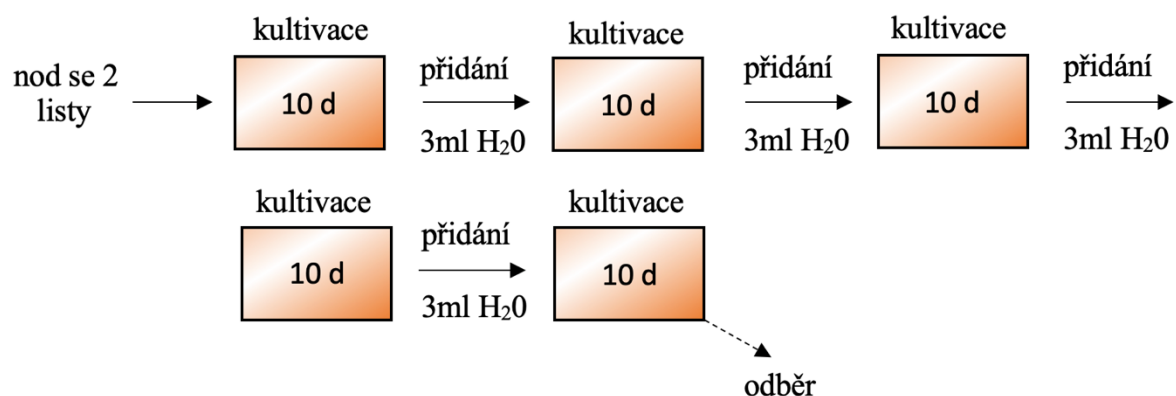
3.2.8 Zpracování dat

Tabulky a grafy byly vytvořeny v programu Microsoft Excel for Mac v rámci předplatného Microsoft Office 365. Statistické vyhodnocení dat probíhalo v programu jamovi (The jamovi project; verze 1.6.6.0). Všechny hodnoty vkládané do statistického programu jamovi byly zaokrouhleny na tři desetinná místa. Předpoklad, že výběry pocházejí z normálního rozdělení, byl ověřen Shapiro-Wilkovým testem. Předpoklad, že výběry mají shodné rozptyly, byl testován pomocí Levenova testu a podle toho byla zvolená patřičná korekce při porovnávání tří a více souborů dat. Pro porovnání dvou souborů dat byl použit nepárový t-test, v případě nenormálního rozdělení byl použit Mann-Whitneyův test. Pro porovnání třech a více souborů dat (s ověřeným předpokladem, že pocházejí z normálního rozdělení a mají shodné rozptyly) byla použita one-way ANOVA. V případě nenormálního rozdělení dat byla použita Kruskal-Wallis ANOVA. Pro zjištění rozdílu mezi jednotlivými skupinami byly použity post-hoc testy, v případě shodných rozptylů byl použit Tukeyův post-hoc test, v případě neshodných rozptylů byl použit Games-Howellův post-hoc test.

3.3 Experimenty

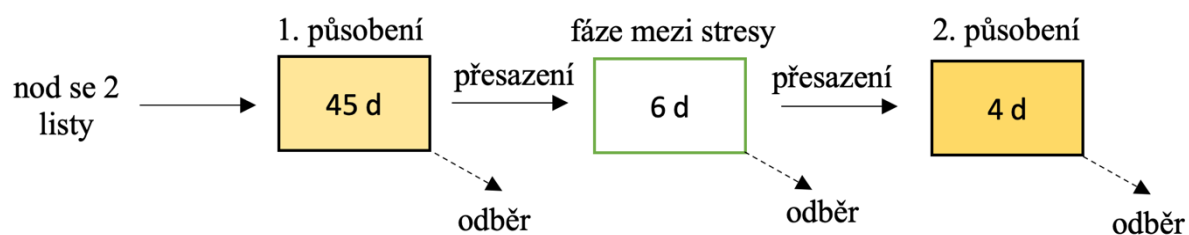
3.3.1 Schéma kultivací pod polopropustnou membránou

3.3.1.1 Design A

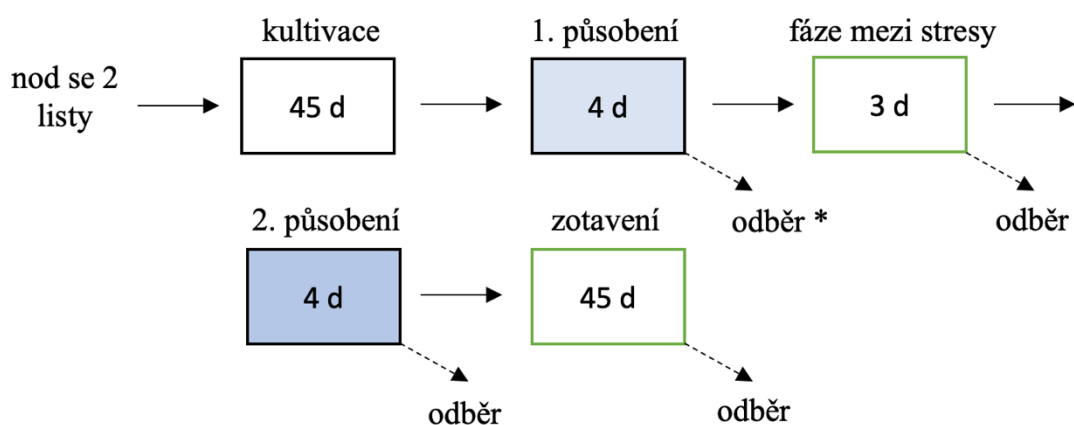


3.3.2 Schémata kultivací pod alobalovým víčkem

3.3.2.1 Design B (Schéma pro PRIMUS 10)



3.3.2.2 Design C



* pouze varianta priming +

3.3.3 Přehled experimentů

1. PRIMUS 2

Materiál: *Olea europaea* cv. Picual

Experimentální design: A

Ošetření média: 0 %, 1 %, 3 % sacharosy

Víčko: PP fólie s polopropustnou membránou (kontrola jen PP fólie)

Ošetření (% sacharosy)	0	1	3	3*
---------------------------	---	---	---	----

* jen PP fólie

2. PRIMUS 3

Materiál: *Olea europaea* cv. Picual

Experimentální design: A

Ošetření média: 1 % sacharosy, 0,5 % sacharosy + 0,5 % manitolu

Víčko: PP fólie s polopropustnou membránou

Ošetření (% sacharosy + % manitolu)	1 + 0	0,5 + 0,5
--	-------	-----------

3. PRIMUS 4, 5, 6

Materiál: *Olea europaea* cv. Picual

Experimentální design: A

Ošetření: 0 %, 2 %, 4 % PEG 4000

Víčko: PP fólie s polopropustnou membránou

Ošetření (% PEG 4000)	0	2	4
--------------------------	---	---	---

4. PRIMUS 7

Materiál: *Olea europaea* cv. Picual

Experimentální design: A

Ošetření: 0 %, 2 %, 4 % PEG 6000

Víčko: PP fólie s polopropustnou membránou

Ošetření (% PEG 4000)	0	2	4
--------------------------	---	---	---

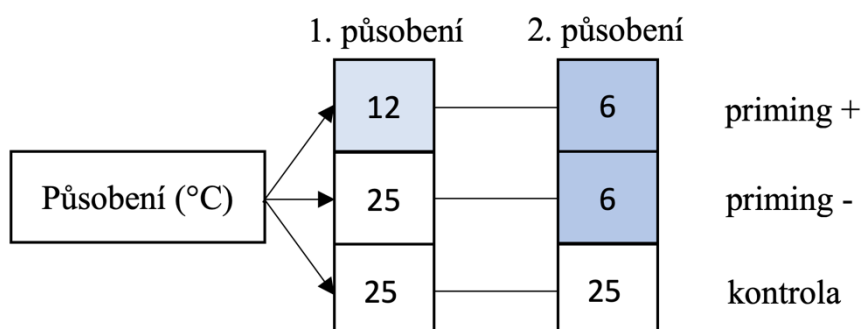
5. PRIMUS 9, 12, 13

Materiál: *Olea europaea* cv. Picual

Experimentální design: C

Ošetření: chladové ošetření

Víčko: alobal



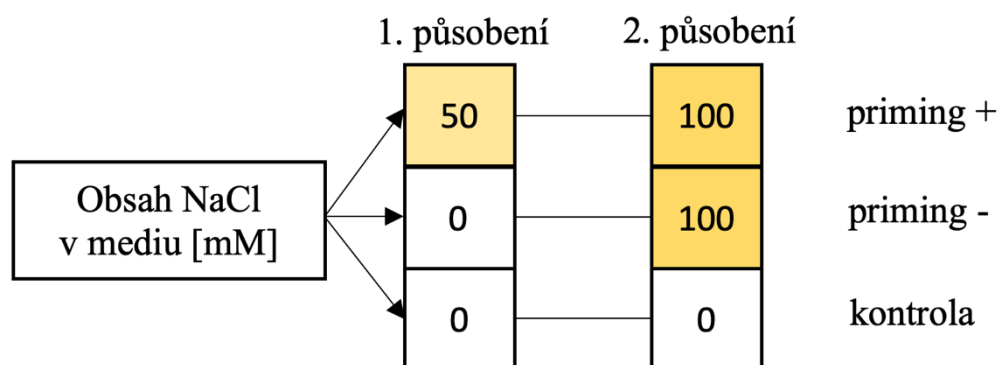
6. PRIMUS 10

Materiál: *Olea europaea* cv. Picual

Experimentální design: B

Ošetření: opakované zasolení

Víčko: alobal



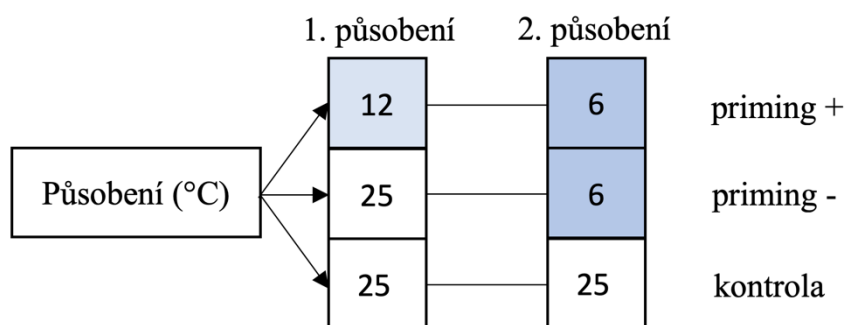
7. PRIMUS 11, 14

Materiál: *Olea europaea* subsp. *laperrinei*

Experimentální design: C

Ošetření: chladové působení

Víčko: alobal



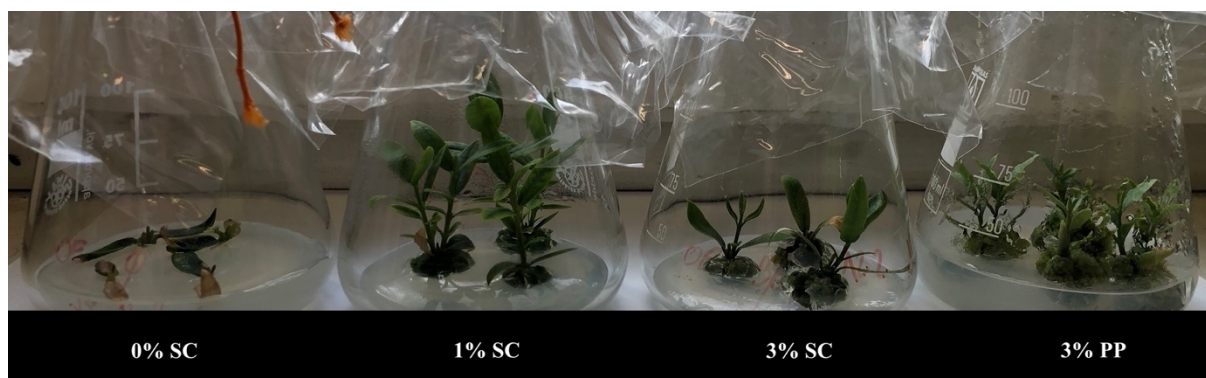
4 Výsledky

4.1 Experimenty s *Olea europaea* cv. Picual (kulturní olivovník)

4.1.1 Optimalizace kultivačních podmínek

4.1.1.1 Vliv koncentrace sacharidů v médiu na růstové charakteristiky oliv kultivovaných v podmínkách *in vitro* (Primus 2)

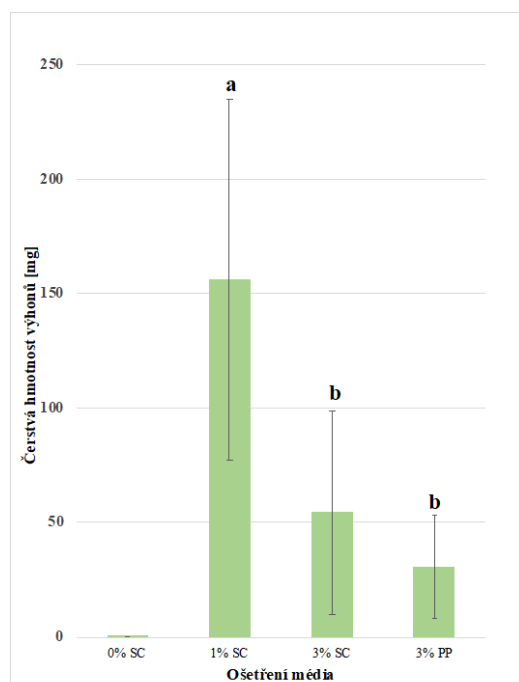
Cílem experimentu bylo ověřit vliv různé koncentrace sacharidů v médiu na růst oliv v kultivačním nádobách krytých polypropylenovou fólií (PP) s polopropustnou membránou Suncap (dále označeno jako polopropustná fólie) v podmínkách *in vitro*. Cílem bylo také ověřit, zda se oliva dá efektivně pěstovat čistě fotoautotrofně tj. bez sacharidů v médiu, což by nám dávalo při budoucím měření endogenních hladin sacharidů jistotu, že byly produkovány rostlinami nikoli „jen“ přijaty z média. Na základě dlouhodobých zkušeností pracoviště a z literatury jsem vybral 3% koncentraci sacharidů v médiu (kombinace sacharosy a manitolu v poměru 1:1) pro ověření optimálního růstu oliv v podmínkách *in vitro*. Dohromady jsem kultivoval 4 skupiny rostlin. Kontrolní varianta byla kultivovaná na 3 % sacharidů (1.5 % sacharosa + 1.5 % manitol) a byla krytá pouze polypropylenovou fólií, a byla označena jako 3% PP. Ostatní varianty kryté polopropustnou fólií měly v médiu k dispozici sacharidy v základní koncentraci (ozn. 3% SC; 1.5 % sacharosa + 1.5 % manitol), snížené (1% SC; 0.5 % sacharosa + 0.5 % manitol) nebo žádné sacharidy (plně fotoautotrofní kultura – ozn. 0% SC). Během kultivace docházelo k prorůstání úžlabních pupenů a tvorbě kalusu na bázi primárního explantátu (nodu). K rostlinám krytých polopropustnou fólií byly čtyřikrát během kultivace asepticky přidány 3 ml sterilní destilované vody do každé kultivační nádoby, a to cca v intervalu 10 dní, protože docházelo k vysychání a poklesu hladiny kultivačního média. Po tomto zásahu vždy bohužel část kultur zkontaminovala. Pro zhodnocení vlivu různé koncentrace sacharidů na růst byly rostliny po 50 dnech vyjmuty z kultivačních nádob, rozděleny na kalus a výhon (odstraněn původní primární explantát) a tyto části byly zváženy na analytických vahách. Část listů z odebraných výhonů byla použita na přípravu vzorků pro měření endogenních sacharidů. Jak naznačuje ilustrační fotografie č.2, pupeny primárních explantátů kultivované v médiu bez přídavku sacharidů neprorůstaly vůbec.



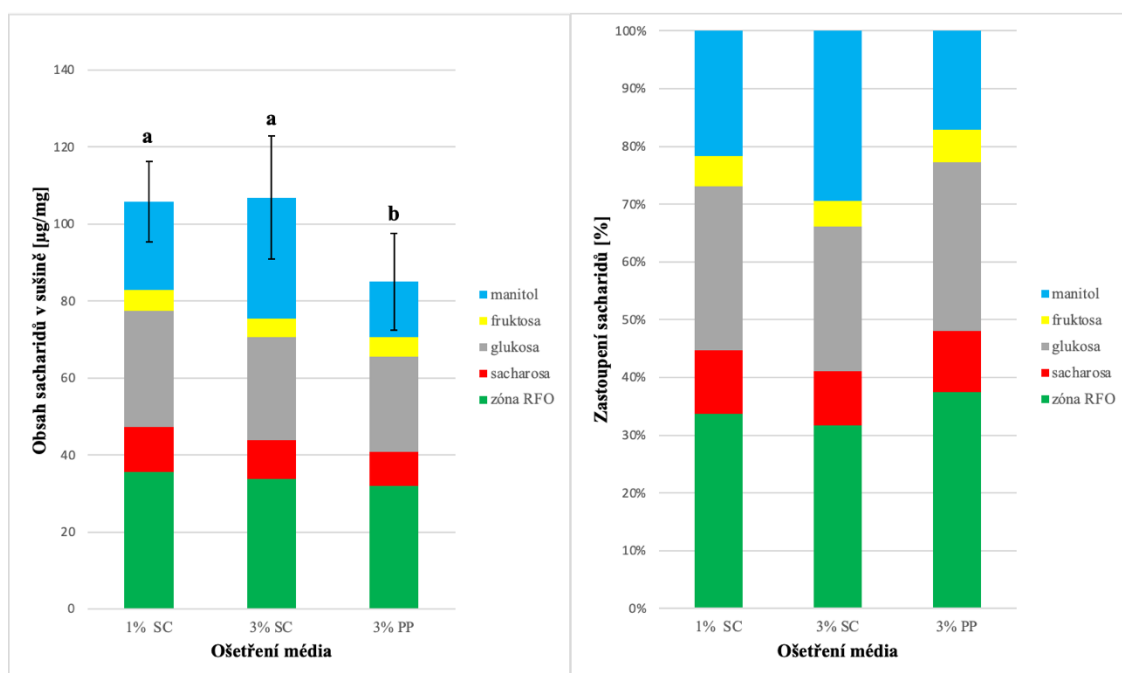
Obrázek č.2: Vliv koncentrace sacharidů v médiu a propustnosti víčka na růstové charakteristiky kulturního olivovníku. Čísla označují koncentraci sacharidů přidaných do kultivačního média; SC označuje krytí PP fólií s integrovanou polopropustnou membránou a PP označuje krytí jen nepropustnou PP fólií. Fotografie byla pořízena na konci experimentu, tj. 50 dní od začátku kultivace. Je patrný pokles média v důsledku vysychání u variant 0% SC, 1% SC a 3% SC

Nejvyšší přírůstek výhonů byl zjištěn u varianty 1% SC, průměrný přírůstek činil 156 mg. Varianta 3% SC měla průměrný přírůstek 54 mg, kontrolní varianta 3% PP měla nejnižší přírůstek, a to 30 mg. Mezi skupinami byl nalezen signifikantní rozdíl ($p \leq 0,001$; One-Way ANOVA), a to mezi variantou 1% SC a zbývajícemi dvěma variantami 3% SC a 3% PP (viz graf č.2). Jelikož rostliny na médiu s 1 % obsahem sacharidů kryté polopropustnou fólií měly nejvyšší přírůstky, bylo rozhodnuto, že se bude pro další experimenty používat tato koncentrace sacharidů.

Mezi průměrnými obsahy celkových rozpustných sacharidů byl nalezen signifikantní rozdíl ($p = 0,001$; One-way ANOVA), a to mezi variantou 3% PP (85 $\mu\text{g}/\text{mg DW}$) a zbývajícemi dvěma 1% SC (106 $\mu\text{g}/\text{mg DW}$) a 3% SC (107 $\mu\text{g}/\text{mg DW}$), viz graf č.3. Průměrný obsah manitolu byl u varianty 1% SC 23 $\mu\text{g}/\text{mg DW}$, u varianty 3% SC byl 31 $\mu\text{g}/\text{mg DW}$ a u varianty 3% PP činil 15 $\mu\text{g}/\text{mg DW}$. Jeho zastoupení v celkovém spektru u varianty 1% SC činilo 21 %, u 3% SC byl manitol zastoupený z 29 % a u 3% PP byl zastoupený ze 17 %.



Graf č.2: Přírůstek čerstvé hmotnosti výhonů kulturního olivovníku v závislosti na koncentraci sacharidů v médiu a propustnosti víčka po 50 dnech kultivace. 0% SC – bez přídavku sacharidů v médiu; 1% SC – s 1 % sacharidů v médiu; 3% SC – se 3 % sacharidů v médiu; 3% PP – se 3 % sacharidů v médiu s nepropustnou fólií SC; SC označuje krytí PP fólií s integrovanou polopropustnou membránou a PP označuje krytí jen nepropustnou PP fólií; chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku; rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl (Tukey post-hoc test, $\alpha = 0,05$); $n = 19-32$

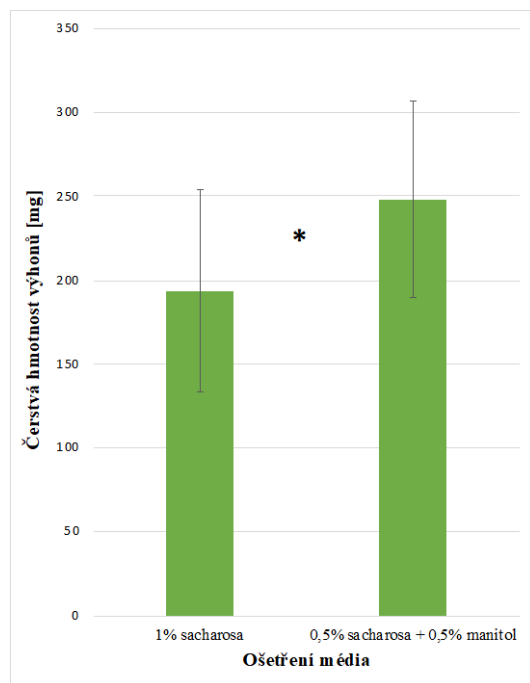


Graf č.3: Obsah a zastoupení sacharidů v listech kulturního olivovníku v závislosti na koncentraci sacharidů v médiu a propustnosti víčka po 50 dnech kultivace. 1% SC – s 1 % sacharidů v médiu; 3% SC – se 3 % sacharidů v médiu; 3% PP – se 3 % sacharidů v médiu; SC označuje krytí PP fólií s integrovanou polopropustnou membránou a PP označuje krytí jen nepropustnou PP fólií; chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku celkových obsahů sacharidů; rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl (Tukey post-hoc test, $\alpha = 0,05$); $n = 6-17$

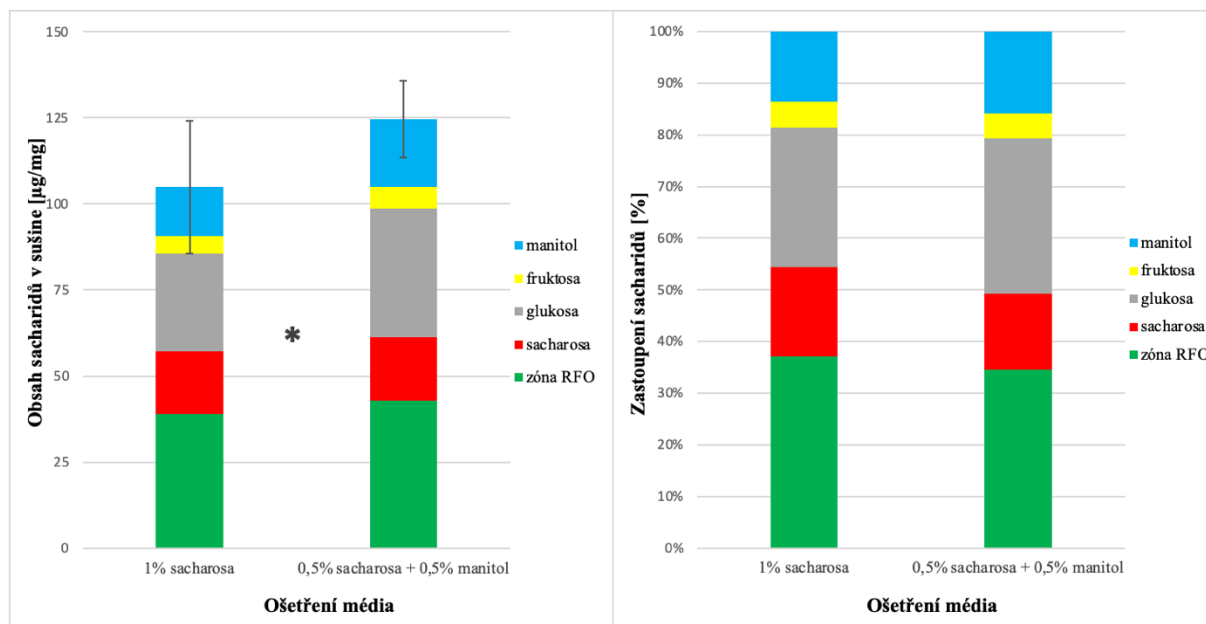
4.1.1.2 Vliv typu sacharidu na růstové charakteristiky, obsah a zastoupení rozpustných sacharidů u kulturního olivovníku (Primus 3)

Na základě předchozího experimentu jsem usoudil, že 1% koncentrace sacharidů (0,5 % sacharosy + 0,5 % manitolu) v kombinaci s polopropustnou fólií umožňuje nejlepší růst oliv. V tomto návazném experimentu bylo cílem ověřit, zda olivovník dokáže uspokojivě růst na médiu s přídatkem pouze 1 % sacharosy. Jelikož v budoucnu bylo cílem měřit hladiny endogenních sacharidů se zaměřením na manitol, kultivace na médiu jen se sacharose by poskytovala jistotu, že naměřené hladiny manitolu nejsou ovlivněny jeho exogenní aplikací do média.

V tomto experimentu jsem sledoval dvě skupiny oliv – 1. skupina rostla na médiu s 1 % sacharidů (0,5 % sacharosy + 0,5 % manitolu) a 2. skupina rostla na médiu s 1 % sacharose. Obě skupiny oliv měly kultivační nádoby překryty polopropustnou fólií. Olivy byly v tomto uspořádání kultivovány 50 dní a během kultivace docházelo k prorůstání úžlabních pupenů a tvorbě kalusu. K rostlinám byly čtyřikrát během kultivace asepticky přidány 3 ml sterilní destilované vody do každé kultivační nádoby, a to cca v intervalu 10 dní. Po tomto zásahu vždy bohužel část oliv zkontaminovala. Pro zhodnocení růstu byly rostliny po 50 dnech vyndány z kultivačních nádob, rozděleny na kalus a prýt (původní explantát odstraněn) a tyto části byly zváženy na analytických vahách. Část rostlin byla také použita na přípravu vzorků pro měření endogenních hladin sacharidů. Největší průměrný přírůstek prýtů 248 mg FW byl zaznamenán u varianty rostoucí na médiu obsahující oba sacharidy. Průměrný přírůstek u varianty rostoucí na médiu jen se sacharose byl 194 mg FW. Mezi variantami byl nalezen signifikantní rozdíl (viz graf č.4; $p = 0,018$; nepárový t-test). Průměrný obsah celkových rozpustných sacharidů u varianty rostoucí jen na sacharose byl 104 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW. Z toho průměrný obsah manitolu byl 14 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW (13,5 %). Druhá varianta rostoucí na mixu sacharidů měla průměrný obsah celkových sacharidů 125 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW, z toho průměrný obsah manitolu byl 20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW (16 %). Mezi oběma variantami byl nalezen signifikantní rozdíl v průměrném obsahu celkových rozpustných sacharidů (viz graf č.5; $p = 0,017$; nepárový t-test), stejně tak byl nalezen signifikantní rozdíl mezi oběma variantami v obsahu manitolu ($p = 0.018$; nepárový t-test). Přestože byl nalezen signifikantní rozdíl v růstu rostlin, obě varianty vykazovaly značný obsah manitolu (avšak signifikantně odlišný), tak vzhledem k zájmu o možnou roli manitolu v reakci na stres jsme pro budoucí experimenty zvolili kultivační variantu, která nebyla exogenní aplikací manitolu do média ovlivňována.



Graf č.4: Příklad č.4: Přírůstek čerstvé hmotnosti výhonů kulturního olivovníku v závislosti na typu sacharidu v médiu po 50 dnech kultivace. 1% sacharosa – s 1 % sacharosy v médiu; 0,5% sacharosa + 0,5% manitol – s 0,5 % sacharosy a 0,5% manitolu v médiu; chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku; hvězdička značí signifikantní rozdíl mezi variantami (nepárový t-test, $\alpha = 0,05$); $n = 15$



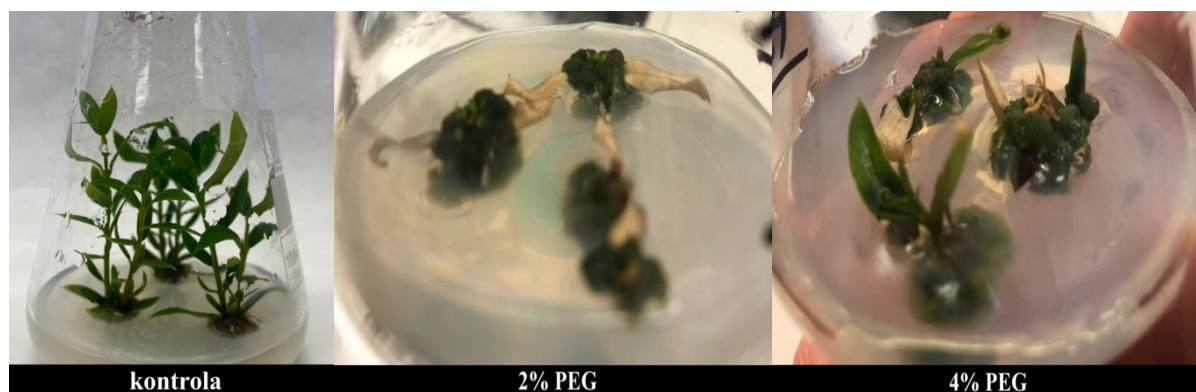
Graf č.5: Obsah a zastoupení sacharidů v listech kulturního olivovníku v závislosti na typu sacharidu v médiu po 50 dnech kultivace. 1% sacharosa – médium obsahující 1 % sacharosy; 0,5% sacharosa + 0,5% manitol – médium obsahující 0,5 % sacharosy a 0,5% manitolu; chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku celkových obsahů sacharidů; hvězdička značí signifikantní rozdíl mezi variantami (nepárový t-test, $\alpha = 0,05$); $n = 15$

4.1.2 Reakce olivovníku na indukovaný stres z nedostatku vody, zasolení a způsob uzavření nádoby

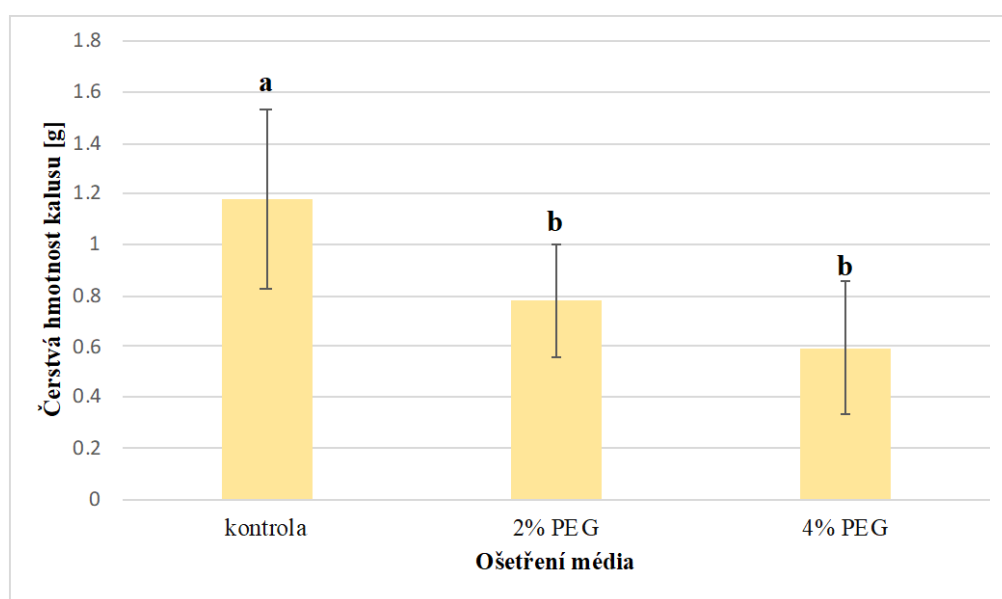
4.1.2.1 Vliv PEG 4000 na růstové charakteristiky a obsah a zastoupení rozpustných sacharidů (Primus 4, Primus 5)

Cílem tohoto experimentu bylo zhodnotit působení osmotického stresu vyvolaného přítomností PEG 4000 v médiu na růstové charakteristiky a obsah a zastoupení endogenních sacharidů u kulturního olivovníku, dílčím cílem bylo vytipovat vhodné subletální hladiny PEG 4000. Rostliny byly vysazeny na experimentální médium se třemi různými koncentracemi PEG v médiu – 0 % (kontrola), 2 % (slabší působení) a 4 % (silnější působení). Kultivační nádoby s rostlinami byly kryty polopropustnou fólií a byla k nim přidávána sterilní destilovaná voda jako v předchozím experimentu, kde byly baňky kryty stejnou polopropustnou fólií. Po tomto zákroku se vždy u několika baňek objevila kontaminace na povrchu média, tyto baňky byly z experimentu vyřazeny. Na konci experimentu byla objevena kontaminace u všech zbylých rostlin, a tak musel být experiment opakován. V sestavení popsaném výše byly rostliny znovu kultivovány 50 dní, poté byly změřeny růstové charakteristiky a odebrány vzorky na měření endogenních sacharidů.

Měřitelný přírůstek čerstvé hmotnosti výhonů byl na konci experimentu zjištěn jen u kontrolní varianty rostlin, přírůstek činil 189 mg (data nejsou prezentována). U zbylých variant byla cca po 10-15 dnech od začátku kultivace pozorována aktivace axilárních pupenů, ovšem tyto pupeny ke konci experimentu změnily svou barvu ze zelené na světle žlutou a zaschly, na konci experimentu se zdály být jednotlivé pupeny mrtvé (viz ilustrační obrázek č.3). Stále však docházelo k růstu kalusu na bázi explantátů, a to u všech tří variant. U všech variant měl kalus jasně zelenou barvu. Jelikož došlo k prorůstání pupenů jen u kontrolní varianty rostlin, nebyly odebrány vzorky na měření hladin endogenních sacharidů v zamýšleném rozsahu u všech variant. Průměrný přírůstek kalusu u kontrolní varianty byl 1,18 g, na 2% PEG byl 0,78 g a na 4% PEG byl 0,59 g. Mezi skupinami byl nalezen signifikantní rozdíl v přírůstcích kalusu ($p < 0,001$; One-Way ANOVA), a to mezi kontrolní variantou a zbývajícími dvěma vystavených působení PEG (viz graf č.6). Médium s přídatkem PEG mělo negativní vliv nejen na celkové prorůstání pupenů, ale i signifikantně na růst kalusů.



Obrázek č.3: Vliv PEG 4000 na prorůstání výhonů a kalusu u kulturního olivovníku po 50 dnech kultivace. 2% PEG – skupina rostlin pěstovaná s 2 % PEG 4000 v médiu, 4% PEG – skupina rostlin pěstovaná s 4 % PEG v médiu. Na fotografii je patrný jasně zelený kalus a zaschlé prorostlé axilární pupeny (u variant 2% PEG a 4% PEG).



Graf č.6: Čerstvá hmotnost kalusu v závislosti na obsahu PEG 4000 v médiu u kulturního olivovníku po 50 dnech kultivace. Kontrola – skupina rostlin rostoucí na médiu bez PEG, 2% PEG – skupina rostlin rostoucí na médiu s přidavkem 2 % PEG, 4% PEG – skupina rostlin rostoucí na médiu s přidavkem 4 % PEG; chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku; rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl (Tukey post-hoc test, $\alpha = 0,05$); $n = 24$

4.1.2.2 Vliv PEG 4000 na růstové charakteristiky a obsah askorbátu (Primus 6)

Tento pokus byl opakováním pokusu Primus 4 a 5 a byl proveden v identickém sestavení a trvání. Média s přídavkem PEG 4000 měla identický účinek jako v předchozím pokusu – došlo k aktivaci axilárních pupenů, jejich mírnému zvětšení, poté došlo k jejich žloutnutí až nakonec zaschly. Prorůstaly jen segmenty rostoucí na kontrolním médiu. Část rostlin kontaminovala zřejmě v důsledku pravidelného přidávání sterilní destilované vody. Rostliny byly kultivovány 50 dní, a nakonec v tomto experimentu byly odebrány jen vzorky z kontrolních rostlin na optimalizaci metodiky měření askorbátu. Průměrný obsah askorbátu byl 43 ug/g FW (směrodatná odchylka 25; n = 7).

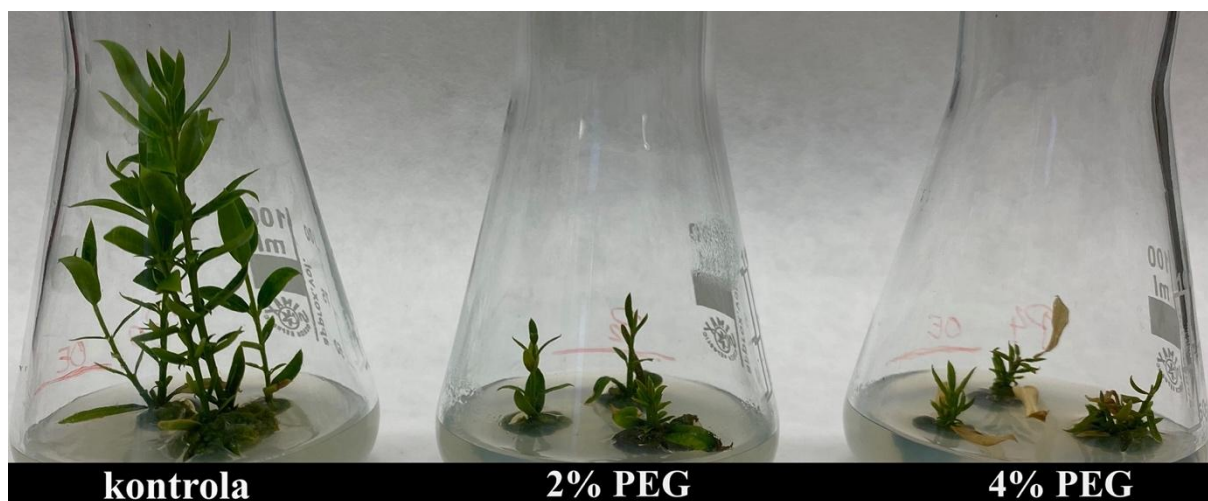
Přidání PEG 4000 do média mělo letální účinek na nodální segmenty kulturního olivovníku a bylo od jeho použití v budoucích experimentech upuštěno.

4.1.2.3 Vliv PEG 6000 na růstové charakteristiky, obsah a zastoupení rozpustných endogenních sacharidů (Primus 7)

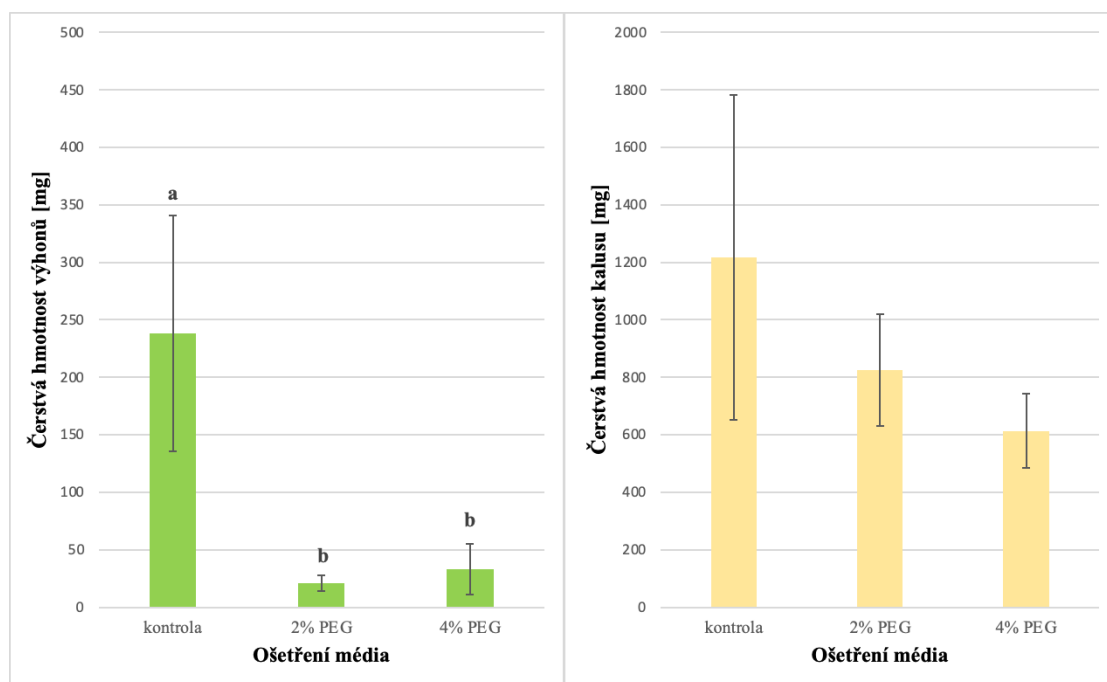
Cílem tohoto experimentu bylo zhodnotit vliv PEG 6000 na růstové charakteristiky, obsah a zastoupení endogenních sacharidů u kulturního olivovníku, dílčím cílem bylo nalézt vhodné subletální hladiny PEG 6000. PEG s vyšší molekulární hmotností než v předchozích experimentech byl vybrán pro jeho potenciální nižší toxicitu. Nodální segmenty byly vysazeny na experimentální médium se třemi různými koncentracemi PEG v médiu – 0 % (kontrola), 2 % (slabší působení) a 4 % (silnější působení). Baňky byly kryty polopropustnou fólií a byla do nich v průběhu kultivace asepticky přidávána sterilní destilovaná voda jako v předchozích experimentech. Po tomto zákroku se vždy u několika baněk objevila kontaminace na povrchu média. Jak naznačuje ilustrační fotografie č.4, podobně jako v minulém experimentu rostliny bez přídavku PEG v médiu prorůstaly bez problémů, rostliny s přídavkem PEG v médiu prorůstaly velmi pomalu, rostliny měly velmi malé listy a stonková část byla zakrslá. Po 50 dnech kultivace byly zjištěny růstové charakteristiky a odebrány vzorky na měření rozpustných endogenních sacharidů. Část skupiny rostlin vystavená působení 2% PEG byla ke konci experimentu zasažená kontaminací na povrchu média, nebylo tak možné odebrat dost vzorků na měření sacharidů. Průměrný přírůstek čerstvé hmotnosti výhonů u kontrolních rostlin byl 238 mg, rostliny rostoucí na médiu s 2 % PEG měly přírůstek výhonů 21 mg, rostliny na médiu s 4 % PEG měly přírůstek výhonů 33 mg. Mezi variantami byl nalezen signifikantní rozdíl v přírůstcích výhonů ($p = 0,016$; One-way ANOVA) a to mezi kontrolní variantou a zbývajících dvěma variantami (viz graf č.7). Průměrná čerstvá hmotnost kalusu u kontrolních rostlin byla 1217 mg. Dále měly hmotnosti kalusu klesající tendenci s rostoucí koncentrací PEG v médiu,

na médiu s 2 % PEG byl přírůstek 826 mg a na médiu s 4 % PEG byl přírůstek 614 mg. Mezi variantami však nebyl nalezen signifikantní rozdíl v přírůstcích kalusu ($p = 0,120$; One-way ANOVA).

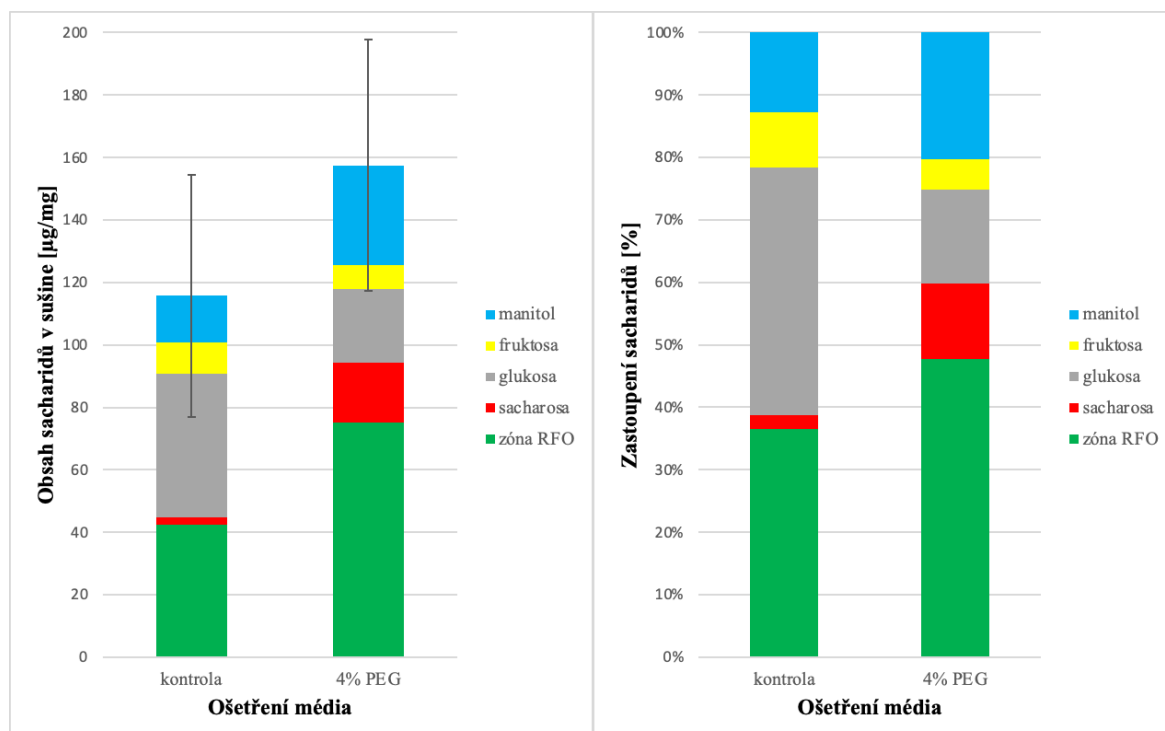
Průměrný obsah všech měřených endogenních rozpustných sacharidů v sušině listů u kontrolní varianty byl 116 $\mu\text{g}/\text{mg}$, u varianty rostoucí s přidavkem 4 % PEG v médiu byl obsah sacharidů 158 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Mezi kontrolní variantou a silnějším působení nebyl nalezen rozdíl v celkovém obsahu sacharidů ($p = 0,137$; nepárový t-test). Patrný byl trend změny v zastoupení jednotlivých sacharidů (viz graf č.8). U varianty s přidavkem 4 % PEG v médiu bylo vyšší zastoupení manitolu (20 % celkových rozpustných sacharidů) a sacharidů komigrujících s RFO (48 % celkových rozpustných sacharidů). U této varianty rostlin bylo také zaznamenáno výrazné zvýšení zastoupení sacharosy (12 % celkových rozpustných sacharidů vs. 2 % u kontrolních rostlin). Vzhledem k častým kontaminacím a nízkým přírůstkům, které neumožňovaly odebírat vzorky v rozsahu pro zamýšlené analýzy a také kvůli časové náročnosti kultivací bylo od experimentů s PEG upuštěno.



Obrázek č.4: Vliv PEG 6000 v médiu na růst kulturního olivovníku po 50 dnech kultivace. Kontrola – skupina rostlin rostoucí na médiu bez PEG; 2% PEG – skupina rostlin rostoucí na médiu s přidavkem 2 % PEG; 4% PEG - skupina rostlin rostoucí na médiu s přidavkem 4 % PEG. Z fotografie jsou patrné velmi nízké přírůstky výhonů u rostlin s přidavkem PEG 6000 v médiu.



Graf č.7: Čerstvé hmotnosti výhonů a kalusů u kulturního olivovníku v závislosti na obsahu PEG 6000 v médiu po 50 dnech kultivace. *Kontrola – skupina rostlin rostoucí na médiu bez PEG; 2% PEG – skupina rostlin rostoucí na médiu s přidavkem 2 % PEG; 4% PEG – skupina rostlin rostoucí na médiu s přidavkem 4 % PEG; chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku; rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl (Tukey post-hoc test, $\alpha = 0,05$); $n = 3-5$*

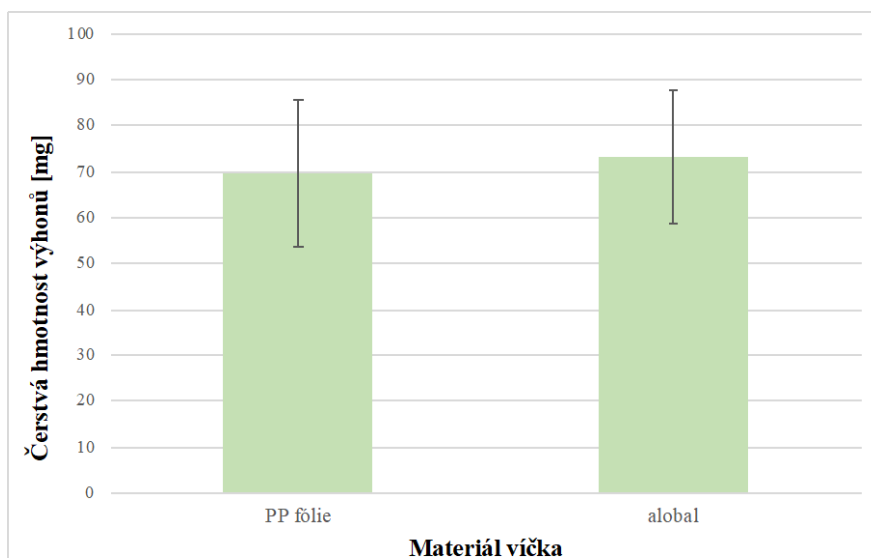


Graf č.8: Obsah a zastoupení rozpustných sacharidů v sušině výhonů v závislosti na obsahu PEG 6000 v médiu u kulturního olivovníku po 50 dnech kultivace. *Kontrola – skupina rostlin rostoucí na médiu bez PEG; 4% PEG – skupina rostlin rostoucí na médiu s přidavkem 4 % PEG; chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku celkových obsahů sacharidů; $n = 4-6$*

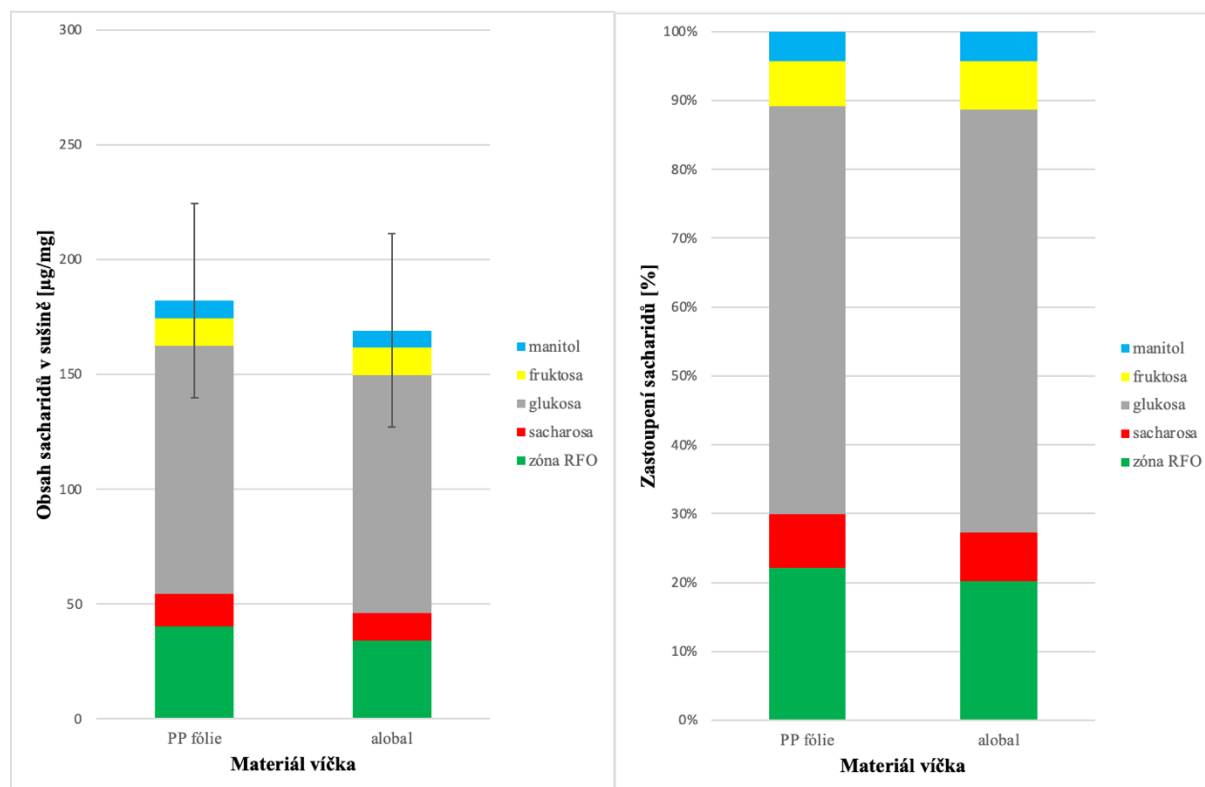
4.1.2.4 Vliv typu víčka na růstové charakteristiky, obsah a zastoupení sacharidů u kulturního olivovníku

Použití polopropustné fólie s polopropustnou membránou vedlo k vysychání a kolísání hladiny kultivačního média. Předchozí experimenty ukázaly, že použití takových víček s sebou nese i veliké riziko častých kontaminací jako důsledek doplňování vody k vysychajícímu médiu, což značně omezuje množství získaného materiálu pro plánované analýzy. Toto riziko se zvyšuje s přihlédnutím k tomu, že obvyklá kultivační doba u olivovníku je cca 4-7 týdnů. Navíc se nepodařilo s pomocí polopropustných fólií dosáhnout uspokojivého růstu kultur za podmínek plné fotoautotrofie, tedy na médiích bez zdroje sacharidu. Při budoucích experimentech jsme chtěli toto riziko eliminovat navrácením se k nepropustným, ale průhledným PP víčkům nebo k nejobvyklejším neprůhledným víčkům (hliníková fólie). V tomto experimentu bylo cílem ověřit, jaký vliv má průhlednost použitého materiálu k výrobě krycího víčka na růstové charakteristiky, obsah a zastoupení sacharidů. Rostliny byly kultivovány na médiu obsahující 1 % sacharosy jako zdroj sacharidů. Hned na začátku byly nodální segmenty rozděleny do dvou skupin podle způsobu krytí kultivační nádoby, jedna byla krytá víčkem z PP fólie a druhá byla krytá alobalovým víčkem, které se běžně používá na udržovací kultivace. Rostliny byly takto kultivovány 50 dní, poté byly rozděleny na kalus a prýt (původní explantát odstraněn) a tyto části byly zváženy na analytických vahách. Část listů s oddělených prýtů byla také použita na přípravu vzorků pro měření endogenních hladin sacharidů.

Přírůstek čerstvé hmotnosti prýtů rostlin rostoucích pod PP fólií byl 69,5 mg a u varianty kryté alobalem byl 73 mg (viz graf č.9). Mezi variantami nebyl nalezen signifikantní rozdíl ($p = 0,548$; nepárový t-test). Průměrný obsah sacharidů v sušině listů byl u obou variant přibližně stejný (viz graf č.10), skupina rostlin rostoucích pod PP fólií měla obsah 182 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW, skupina rostlin rostoucích pod alobalovým víčkem měla 169 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW. Mezi variantami nebyl nalezen signifikantní rozdíl v celkovém obsahu sacharidů ($p = 0,601$; nepárový t-test). Obě varianty měly také přibližně stejné zastoupení jednotlivých analyzovaných sacharidů v celkovém spektru. Například manitol, který nás zajímal v předchozích experimentech pro jeho potenciální ochranné účinky, se na celkovém spektru u obou variant podílel ze 4 % (PP fólie 7,83 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW; alobal 7,33 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW). Z výsledků se zdá, že materiál použitý na výrobu víček tedy nemá výraznější vliv na růstové charakteristiky, produkci a zastoupení sacharidů u kulturního olivovníku. Z tohoto důvodu jsme do dalších experimentálních uspořádání zahrnuli zpět alobalová víčka, která se běžně používají na udržovací kultivace.



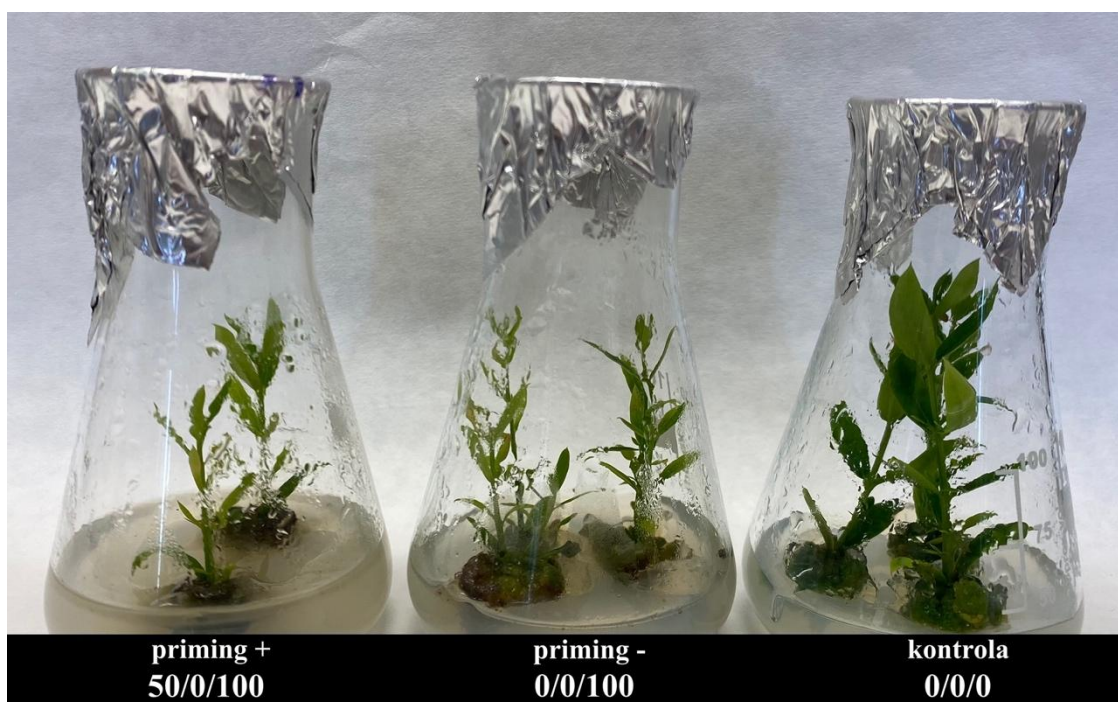
Graf č.9: Čerstvá hmotnost výhonů v závislosti na typu krycího víčka u kulturního olivovníku po 50 dnech kultivace *PP fólie* – baňky uzavřené polypropylenovou folií; *alobal* – baňky uzavřené alobalem; chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku; $n = 13$



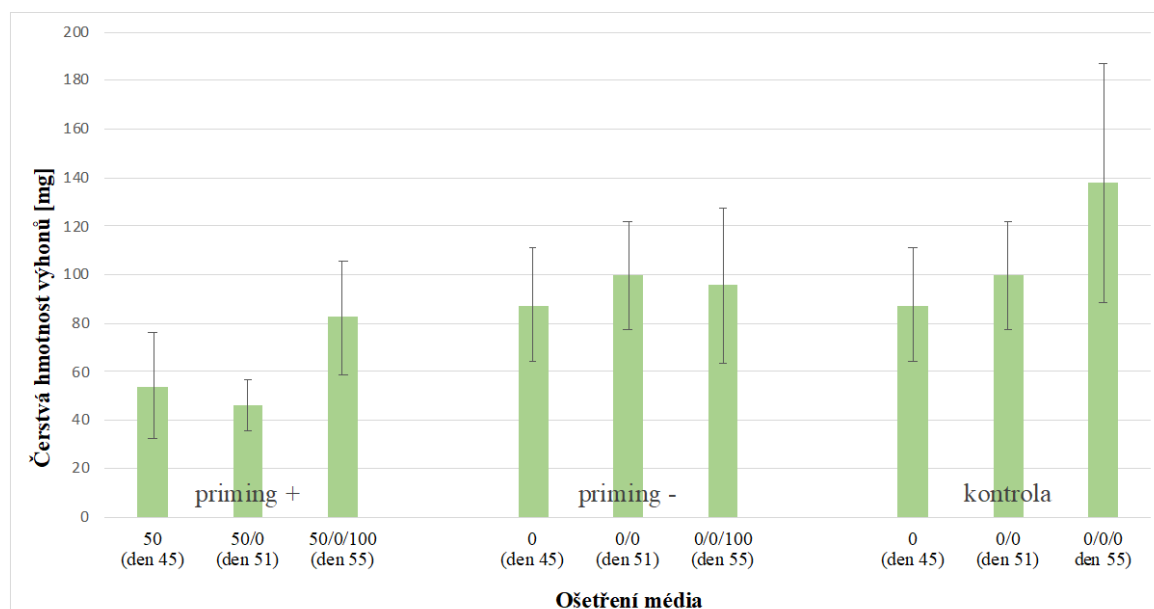
Graf č.10: Obsah a zastoupení sacharidů v sušině listů kulturního olivovníku v závislosti na typu krycího víčka po 50 dnech kultivace. *PP fólie* – baňky uzavřené polypropylenovou folií; *alobal* – baňky uzavřené alobalem; chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku celkových obsahů sacharidů; $n = 6$

4.1.2.5 Vliv opakovaného stresu zasolení na růstové charakteristiky, obsah a zastoupení endogenních rozpustných sacharidů u olivovníku (Primus 10)

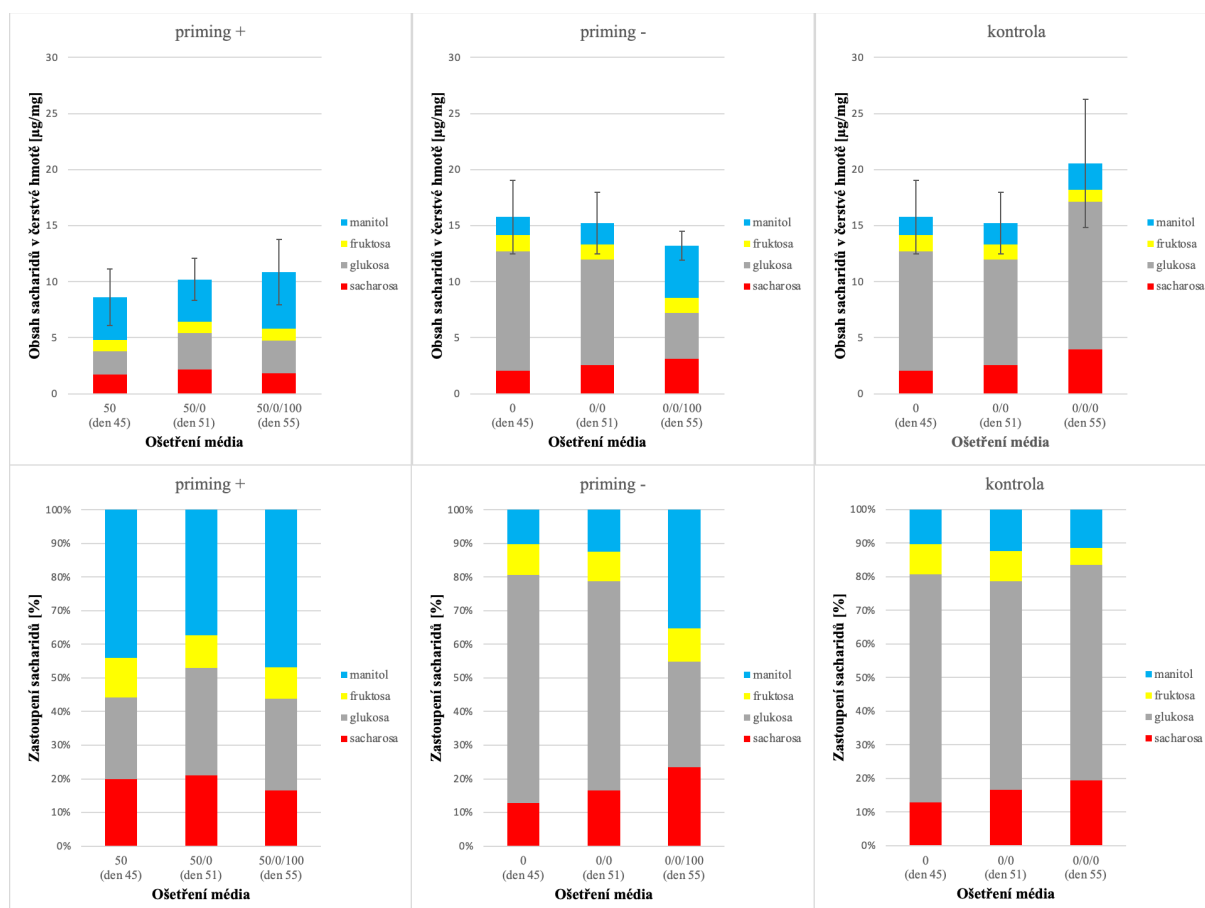
Cílem tohoto experimentu bylo najít subletální koncentrace chloridu sodného pro experimenty sledující vliv opakovaného působení zasolení na obsah a zastoupení endogenních rozpustných sacharidů. Připravené nodální segmenty byly vysázeny na dva typy médií lišící se obsahem chloridu sodného (viz 3.3.3 Přehled experimentů). Po kultivaci na prvním médiu (podle varianty s 50 mM NaCl nebo na kontrolním bez NaCl) (45 dní) byly celé explantáty přeneseny na nové médium bez obsahu NaCl (kultivace bez vlivu zasolení po dobu mezi stresy), a po 6 dnech byly znovu přeneseny na médium indukující 2. stresové působení (podle varianty s 50 mM NaCl, s 100 mM NaCl nebo kontrolní) a zde byly před finálním odběrem kultivovány 4 dny. Opakované přenášení na nové médium mělo za následek masivní nárůst kalusu u všech variant, který je patrný na ilustrační fotografii č.4. Rostliny byly celkem kultivovány 55 dní. Průměrný přírůstek čerstvé hmotnosti výhonů rostlin kultivovaných ze začátku na médiu s obsahem 50 mM NaCl byl po 45 dnech kultivace 54 mg (vs. kontrola 88 mg). Na konci experimentu průměrný přírůstek u varianty priming + činil 82 mg, u varianty rostlin vystavených jen silnějšímu 2. působení NaCl (varianta priming -) činil 95 mg a u kontrola měla 138 mg (viz graf č.11). Byly odebrány vzorky celých výhonů na měření endogenních rozpustných sacharidů. Chlorid sodný ovlivňoval kvalitu chromatogramů jednotlivých vzorků, a jelikož má podobný retenční čas jako RFO, bylo obtížné tyto dvě složky bezpečně odlišit, proto byly RFO z celkového zhodnocení vlivu vynechány. U skupiny od počátku kultivace vystavené 50 mM chloridu sodnému byl obsah sacharidů v čerstvé hmotnosti prýtů při prvním (45. den) a druhém odběru (51. den) přibližně stejný a neměnilo se ani zastoupení jednotlivých sacharidů. Výrazné je však jiné zastoupení sacharidů vůči kontrolním rostlinám (viz graf č.12). Manitol má podíl na celkovém obsahu rozpustných sacharidů u varianty priming + při prvním odběru přes 40 % (kontrola cca 10 %) a podíl manitolu se výrazně nemění v průběhu celého experimentu, podobné zvýšené zastoupení manitolu bylo patrné u této varianty i při posledním odběru po 2. působení chloridu sodného (56. den). U varianty vystavené jen silnému působení (priming -) je také znatelný posun v zastoupení manitolu, po silném působení (56. den) dosahuje podíl manitolu 35 %. Z výsledků je patrné, že po primingu zůstává vysoký podíl manitolu i po fázi mezi stresy a rostlina tak vstupuje do silnějšího stresu již se „stresovým sacharidovým spektrem“. Celkový obsah sacharidů u kontrolní varianty byl s přihlédnutím ke směrodatné odchylce podobný při všech odběrech a neměnilo se ani nijak výrazně zastoupení jednotlivých sacharidů.



Obrázek č.4: Vliv opakovaného zasolení na kulturní olivovník po 55 dnech kultivace. Číslo oddělená lomítkem představují koncentrace chloridu sodného v jednotlivých médiích v pořadí, jak jim byly vystaveny rostliny.



Graf č.11: Příklad růstu čerstvé hmotnosti výhonů kulturního olivovníku v závislosti na množství chloridu sodného v médiu. Číslo u jednotlivých sloupečků oddělená lomítkem představují jednotlivé koncentrace NaCl v mM, které byly v kultivačním médiu; čísla v závorkách představují dny od počátku kultivace; text v grafu označuje variantu; chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku; $n = 5-8$



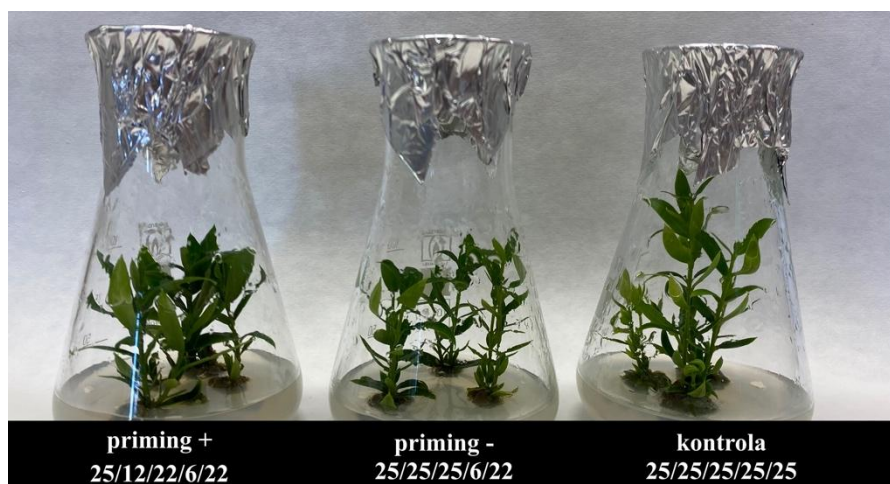
Graf č.12: Obsah a zastoupení sacharidů v čerstvé hmotě výhonů kulturního olivovníku v závislosti na množství chloridu sodného v médiu. Číslo u jednotlivých sloupečků oddělená lomítkem představují jednotlivé koncentrace NaCl v mM, které byly v kultivačním médiu; čísla v závorkách představují dny od počátku kultivace; nadpis značí experimentální skupinu; chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku celkových obsahů sacharidů; n = 5-8

4.1.3 Reakce olivovníku na opakované působení suboptimálních teplot

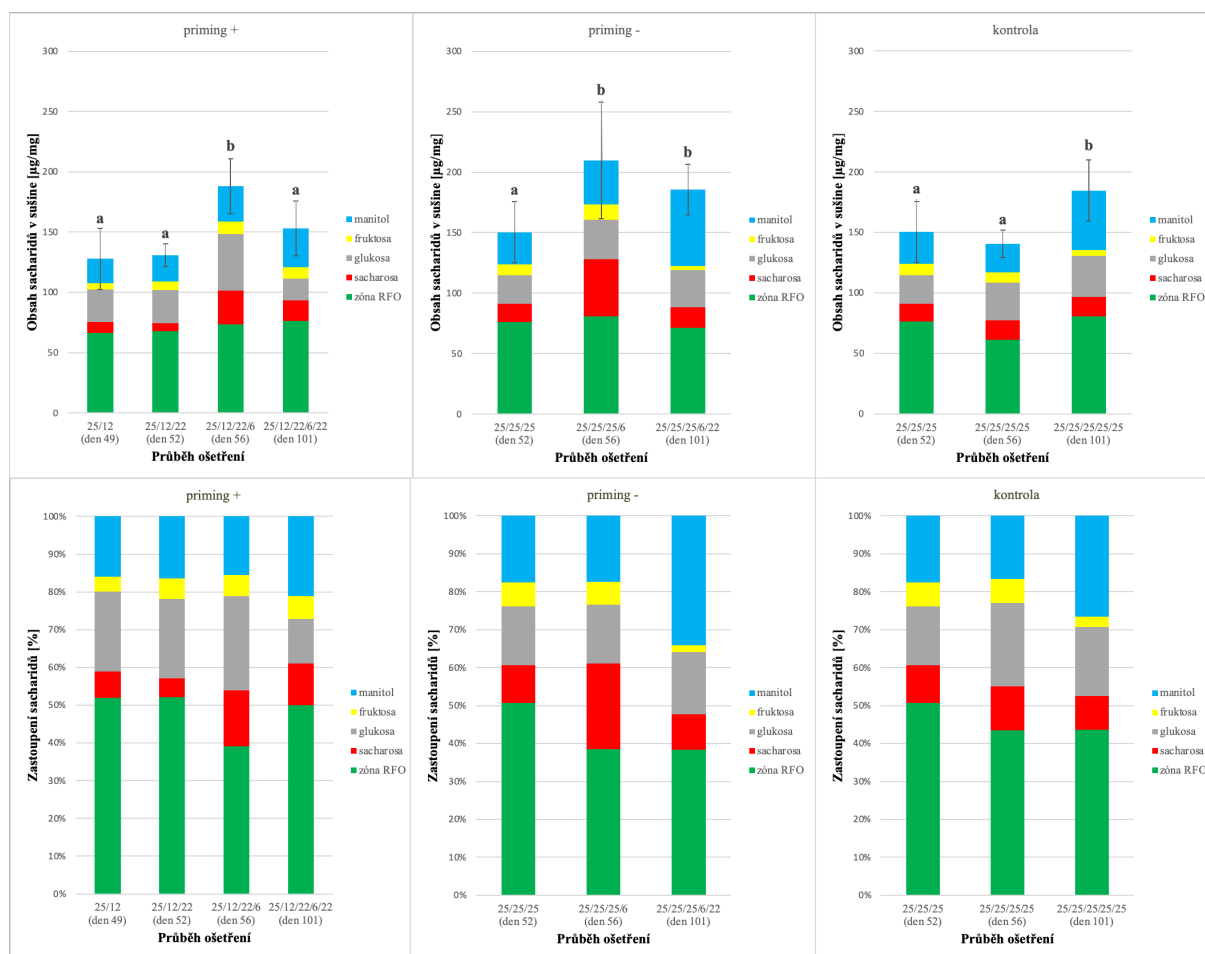
4.1.3.1 Vliv opakovaného působení nízkých teplot na obsah endogenních rozpustných sacharidů (Primus 9)

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit jaký má vliv opakované chladové působení na obsah a zastoupení endogenních rozpustných sacharidů. Rostliny byly předpěstovány po dobu 45 dnů v udržovacím boxu (25 °C), poté byly náhodně rozděleny do jednotlivých experimentálních variant dle schématu (viz 3.3.2.2 Design C). Rostliny varianty priming + byly po předkultivaci přeneseny jako první, aby byly vystaveny teplotě 12 °C (po dobu 4 dnů), poté byla teplota v boxu zvýšena na 22 °C (po dobu 4 dnů). V tento moment byly přeneseny také rostliny varianty priming - a box byl převeden teplotu 6 °C (po dobu 4 dnů), nakonec byla teplota nastavena na 22 °C po dobu trvání fáze zotavení (45 dní). Kontrolní rostliny byly po celou dobu kultivovány v udržovacím boxu při teplotě 25 °C. Jak naznačuje ilustrační obrázek č.5, rostliny rostly a vypadaly téměř identicky nezávisle na chladovém ošetření.

Obsah celkových sacharidů u varianty vystavené primingu se mezi jednotlivými odběry signifikantně lišil (One-way ANOVA, $p = 0,001$), a to po druhém silnějším chladovém působení (56. den), kdy obsah sacharidů byl $188 \mu\text{g}/\text{mg DW}$, a zbývajících třemi odběry ze stejné varianty (viz graf č.13). U této varianty (56. den) byl také patrný trend vyššího zastoupení sacharosy po působení 6°C a zbývajícím odběrům, které činilo bezmála 15 %. Výraznější zastoupení sacharosy (11 %) bylo patrné u této varianty i po zotavení, přestože se celkový obsah sacharidů snížil na průměrných $153 \mu\text{g}/\text{mg DW}$. Obsahy celkových průměrných sacharidů mezi jednotlivými odběry u varianty vystavené jen silnějšímu stresu (priming -) se signifikantně lišily (One-Way ANOVA; $p = 0,02$), lišil se odběr po vystavení 6°C od zbývajících odběrů (viz graf č.13). Obsah sacharidů po působení 6°C u této varianty byl to vůbec nejvyšší obsah celkových sacharidů v celém experimentu ($210 \mu\text{g}/\text{mg DW}$). Jako u varianty vystavené primingu (priming +) i zde došlo po vystavení chladu k navýšení zastoupení sacharosy v celkovém obsahu, zastoupení po vystavení 6°C činilo 22 %. To je dvojnásobek v porovnání se variantou priming + ve stejném odběrném bodě (den 56). Po 45 dnech zotavení se u varianty priming - neměnil signifikantně průměrný obsah celkových sacharidů, ale změnilo se zastoupení jednotlivých sacharidů. Nejvýraznější změna v zastoupení je patrná u manitolu, kdy jeho zastoupení po fázi zotavení bylo bezmála 34 %. U varianty priming + takový výrazný posun v zastoupení manitolu v celkovém spektru zaznamenán nebyl (21 %). Průměrný obsah celkových sacharidů u kontrolní varianty byl u prvních dvou odběrů přibližně stejný (první odběr $141 \mu\text{g}/\text{mg DW}$; druhý odběr $149 \mu\text{g}/\text{mg DW}$), k signifikantnímu navýšení (Tukey post-hoc test; $\alpha = 0,05$) došlo při posledním odběru (den 101) na $185 \mu\text{g}/\text{mg DW}$.



Obrázek č.5: Vliv opakovaného chladového působení na růst kulturního olivovníku po 101 dnech. Text označuje variantu rostlin; čísla u jednotlivých variant oddělená lomítkem představují teploty, kterým byly rostliny před pořízením fotografie vystaveny. Na fotografii není patrný výraznější rozdíl v růstu rostlin mezi jednotlivými variantami ošetření.

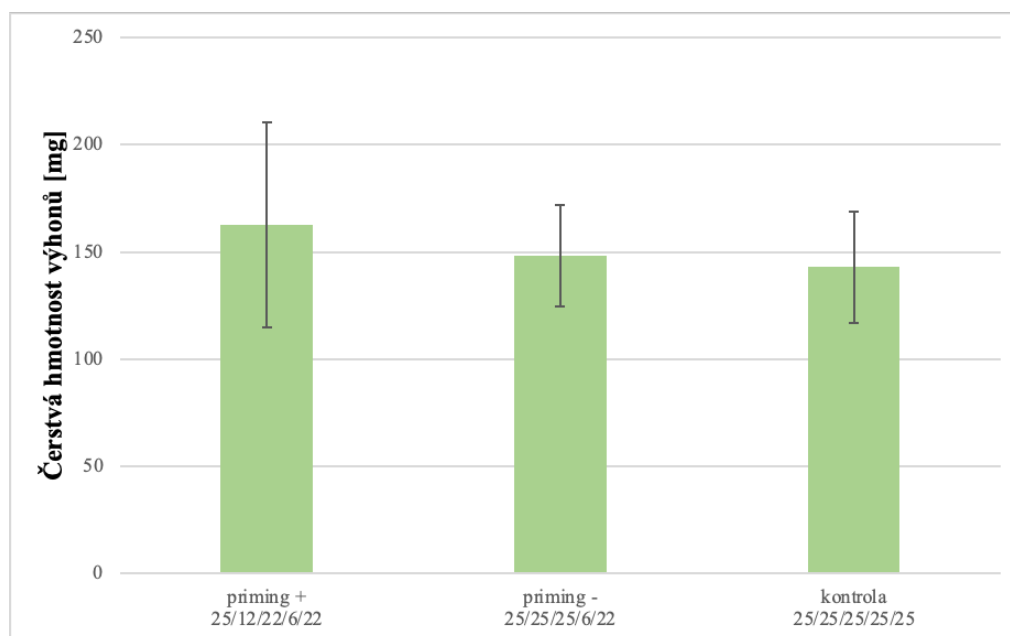


Graf č.13: Obsah a zastoupení sacharidů v sušině listů u kulturního olivovníku v závislosti na opakovaném chladovém působení. Čísla u jednotlivých sloupců oddělená lomítkem představují teploty, kterým byly rostliny před odběrem vystaveny; čísla v závorkách představují dny od počátku kultivace; nadpis značí experimentální skupinu; chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku celkových obsahů sacharidů; rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl (Tukey post-hoc test; $\alpha = 0,05$); $n = 3-11$

4.1.3.2 Vliv opakovaného působení nízkých teplot na růstové charakteristiky, obsah a zastoupení endogenních rozpustných sacharidů (Primus 12) – opakování Primus 9

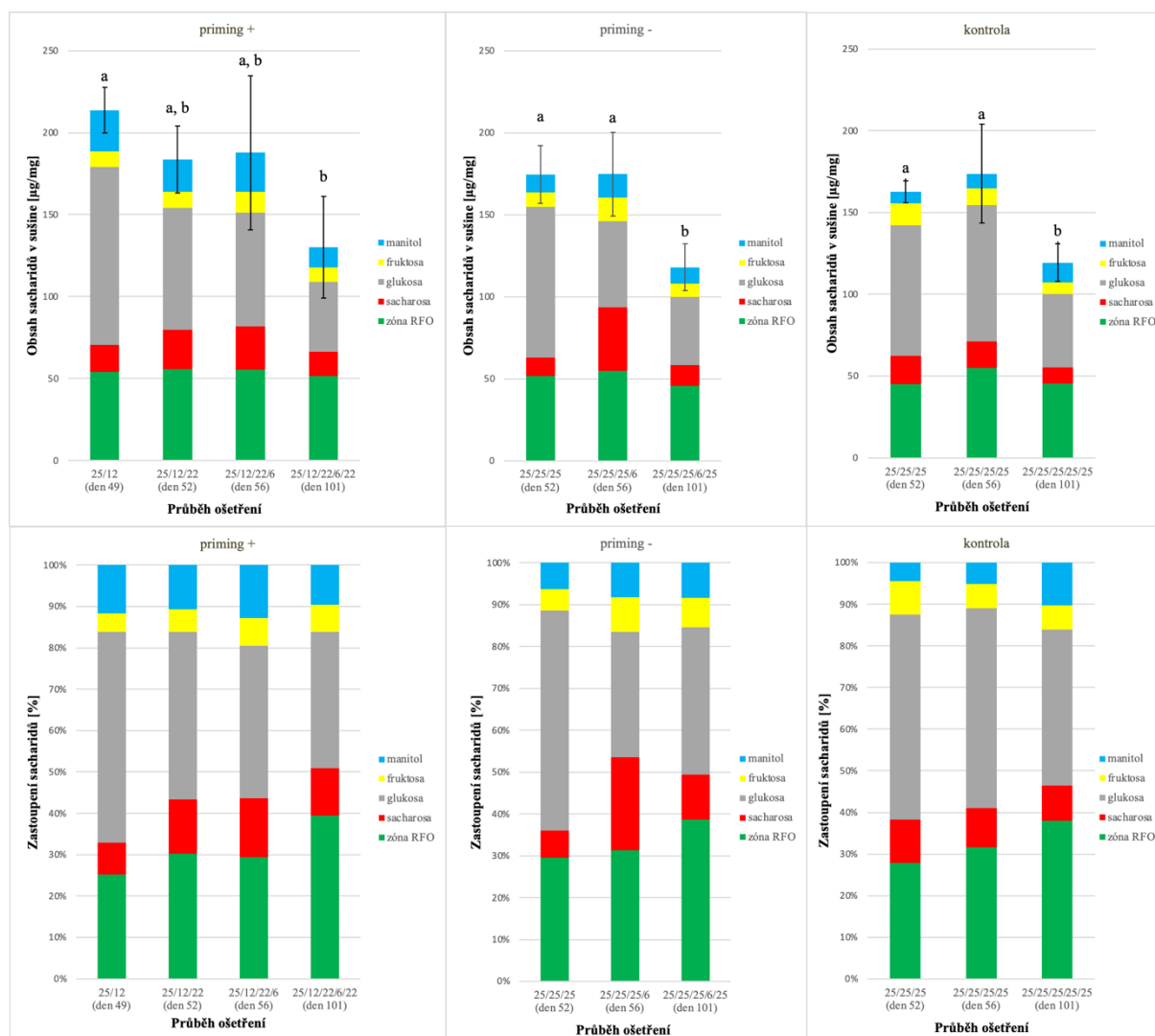
Tento experiment byl proveden v identickém sestavení jako výše popsáný experiment Primus 9. Na konci experimentu (po 101 dnech) byly odebrány celé výhony na zhodnocení růstových charakteristik. V průběhu experimentu byly také postupně odebírány vzorky listů z přirostlých výhonů na měření endogenních sacharidů. Průměrný přírůstek čerstvé hmoty prýtů měl trend být nejvyšší u varianty vystavené předchozím u primingovému chladovému působení (priming +), přírůstek čerstvé hmoty činil 163 mg. Přírůstek čerstvé hmoty u varianty vystavené jen silnějšímu chladovému působení (priming -) činil 148 mg, přírůstek u kontroly byl 143 mg

(viz graf č.14). Mezi jednotlivými variantami nebyl nalezen signifikantní rozdíl ($p = 0,565$; One-way ANOVA).



Graf č.14: Přírůstek čerstvé hmotnosti výhonů kulturního olivovníku v závislosti na opakovaném chladovém působení po 101 dnech. Text v popisu osy x označuje variantu rostlin; čísla u jednotlivých sloupců oddělená lomítkem představují teploty, kterým byly rostliny před odběrem vystaveny; chybové úsečky představují směrodatnou odchylku; $n = 6-9$

Nejvyšší průměrný obsah sacharidů byl zaznamenán u varianty priming + při prvním odběru po primingovém působení (den 49), obsah sacharidů byl $214 \mu\text{g}/\text{mg DW}$. Během dalších odběrů měl celkový průměrný obsah sacharidů u této varianty klesající tendenci (den 52 činil $184 \mu\text{g}/\text{mg DW}$, den 56 činil $188 \mu\text{g}/\text{mg DW}$, den 101 činil $130 \mu\text{g}/\text{mg DW}$). Podobná klesající tendence byla patrná také u varianty priming -, zde průměrný obsah sacharidů při prvním odběru (den 52) činil $175 \mu\text{g}/\text{mg DW}$, při druhém odběru (den 56) činil $175 \mu\text{g}/\text{mg DW}$ a při posledním odběru (den 101) byl $118 \mu\text{g}/\text{mg DW}$. Kontrolní varianta měla průměrný obsah sacharidů při prvním odběru $163 \mu\text{g}/\text{mg DW}$, při druhém $174 \mu\text{g}/\text{mg DW}$ a při třetím odběru $120 \mu\text{g}/\text{mg DW}$. Podobně jako v předchozím chladovém experimentu jsme pozorovali trend zvýšení zastoupení sacharosy v reakci na 2. stresové působení (den 56), u varianty priming + měla sacharosa zastoupení 14 % a varianty priming - měla zastoupení 22 % (vs. kontrola 9 %). U každé varianty byl nalezen signifikantní rozdíl mezi celkovými obsahy sacharidů v jednotlivých odběrných bodech (priming +: $p = 0,006$; One-Way ANOVA, priming -: $p = 0,001$; One-Way ANOVA, kontrola: $p = 0,001$; One-Way ANOVA). Příslušné rozdíly mezi jednotlivými odběry jsou vyznačeny v grafu č.15.

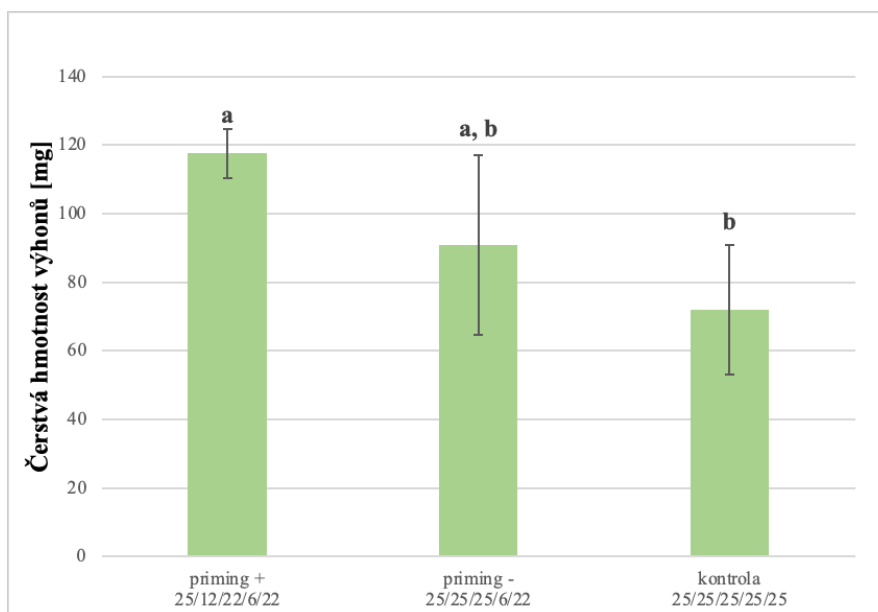


Graf č.15: Obsah a zastoupení sacharidů v sušině listů u kulturního olivovníku v závislosti na opakovaném chladovém působení. Čísla u jednotlivých sloupců oddělená lomítkem představují teploty, kterým byly rostliny před odběrem vystaveny; čísla v závorkách představují dny od počátku kultivace; nadpis značí experimentální skupinu; chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku celkových obsahů sacharidů; rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl (Tukey post-hoc test; $\alpha = 0,05$); $n = 5-6$

4.1.3.3 Vliv opakovaného působení nízkých teplot na růstové charakteristiky, míru úniku elektrolytů, obsah antokyanů a aktivitu antioxidačních enzymů (Primus 13)

Tento experiment byl proveden v identickém provedení jako výše popsány experimenty Primus 9 a Primus 12. V tomto experimentu však bylo cílem znovu analyzovat růstové charakteristiky, změřit obsah antokyanů v listech, zhodnotit míru úniku elektrolytů, a také změřit aktivitu vybraných antioxidačních enzymů. Průměrný přírůstek čerstvé hmotnosti prýtů na konci experimentu (po 101 dnech) u varianty priming + byl 118 mg a byl to nejvyšší naměřený přírůstek, varianta priming - měla přírůstek 91 mg a kontrola měla 72 mg. Mezi variantami byl

nalezen signifikantní rozdíl ($p = 0,025$; One-way ANOVA) a to mezi variantou priming + a kontrolou (viz graf č.16).



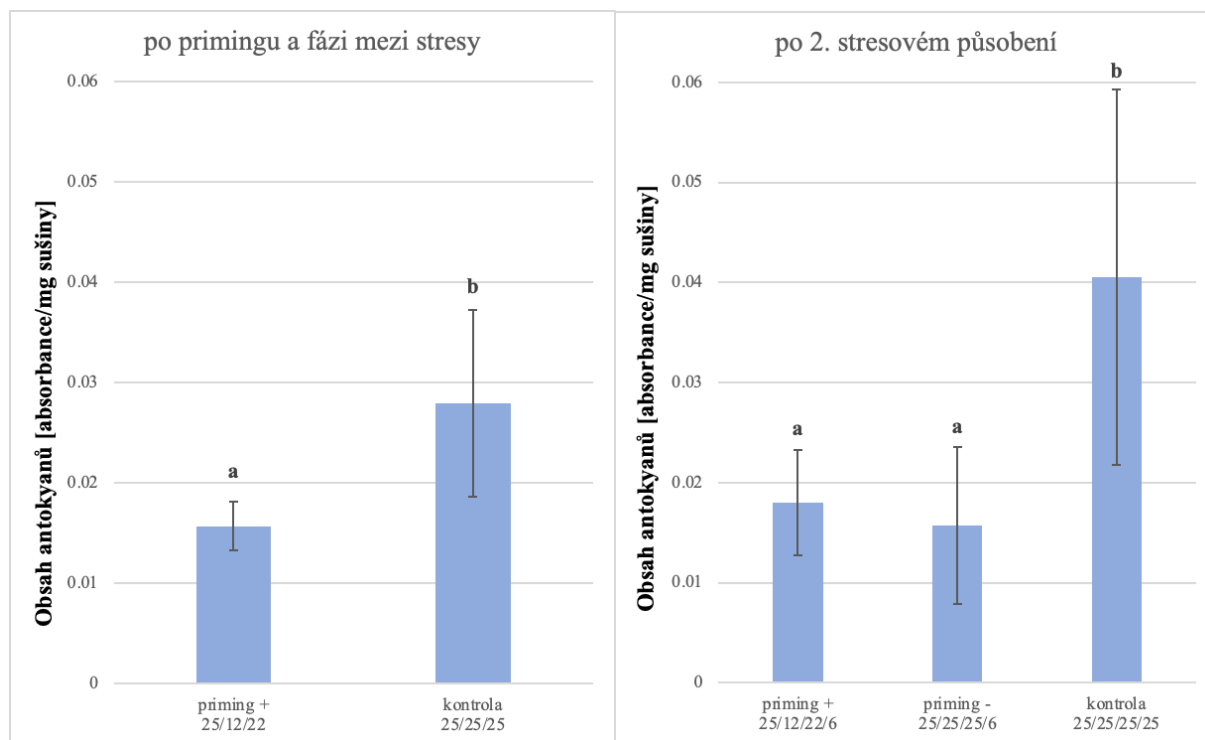
Graf č.16: Přírůstek čerstvé hmotnosti výhonů kulturního olivovníku v závislosti na opakovaném chladovém působení po 101 dnech. Text v popisu osy x označuje variantu rostlin; čísla u jednotlivých sloupců oddělená lomítkem představují teploty, kterým byly rostliny před odběrem vystaveny; chybové úsečky představují směrodatnou odchylku; rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl (Tukey post-hoc test; $p = 0,05$); $n = 4$

Míra úniku elektrolytů (viz tabulka č. 8) u varianty priming + po primingovém působení (den 48) byla 12 %, poté došlo k jejímu poklesu po fázi mezi stresy (22 °C po 4 dny) na 9 %, únik elektrolytů se po stresovém působení opět navýšil na 12 %. U varianty priming - byl únik elektrolytů před stresovým působením (den 52) 12 %, pak se po stresovém působení snížil na 10 %. Kontrola vykazovala jak v bodě „před stresem“ tak „po stresu“ míru úniku elektrolytů 10 %. Výsledky naznačují, že provedené stresové působení mělo minimální vliv na míru úniku elektrolytů. Stresové působení zřejmě nebylo tak silné, aby způsobovalo poškození buněk. Drobné rozdíly mezi odběrovými body a variantami mohou být způsobeny citlivostí detekční metody nebo chybami při manipulaci s živým materiálem.

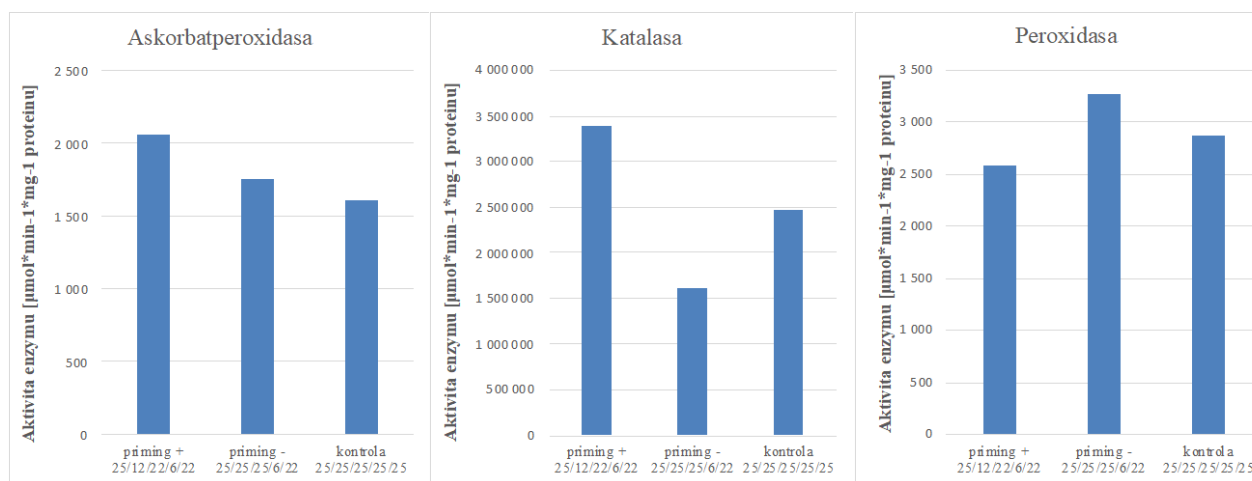
průběh ošetření / varianta	priming +		priming -		kontrola	
po primingu (den 48)	12%	+ - 4,22	-		-	
po fázi mezi stresy (den 52)	9%	+ - 1,26	12%	+ - 2,30	10%	+ - 1,41
po 2. stresovém působení (den 56)	12%	+ - 6,90	10%	+ - 1,65	10%	+ - 1,68
po recovery (den 101)	14%	+ - 5,57	9%	+ - 2,09	8%	+ - 2,52

Tabulka č.8: Míra uniku elektrolytů z prýtu kulturního olivovníku v závislosti na opakovaném působení chladových teplot u kulturního olivovníku. Průměrná míra uniku elektrolytů z prýtu (EL) za 24 hodin vztažená na celkový obsah elektrolytů v prýtu u rostlin kulturního olivovníku po opakovaném chladovém působení; čísla napravo od hodnot EL značí směrodatnou odchylku; n = 4

Obsah antokyanů v listech byl hodnocen ve dvou odběrných bodech – po primingu a fázi mezi stresy před stresovým působením (den 52) a po 2. stresovém působení (den 56). Prvním měřením během dne 52 bylo zjištěno, že primingové působení u varianty priming + má signifikantní vliv na obsah antokyanů a že mezi kontrolou a variantou priming + je signifikantní rozdíl ($p = 0,029$; nepárový t-test). Obsah antokyanů (viz graf č. 17) u varianty primingu + byl vůči kontrole přibližně poloviční. Při druhém měření po druhém působení stresu se také prokázal signifikantní rozdíl mezi jednotlivými variantami ($p = 0,022$; One-way ANOVA). Obě varianty vystavené stresu (tj. varianta vystavená předchozímu primingu „priming +“ a varianta vystavená jen druhému stresu „priming -“) měly přibližně poloviční obsah antokyanů v porovnání s kontrolou. Výsledky naznačují, že jakékoliv první chladové působení signifikantně sníží obsah antokyanů a případné druhé chladové působení již hladinu antokyanů významně nemění.



Graf č.17: Obsah antokyanů v listech u kulturního olivovníku v závislosti na opakovaném chladovém působení. Text v popisu osy x označuje variantu rostlin; čísla u jednotlivých sloupců oddělená lomítkem představují teploty, kterým byly rostliny před odběrem vystaveny; chybové úsečky představují směrodatnou odchylku průměrných obsahů antokyanů; rozdílná písmena představují signifikantní rozdíl (den 52 – nepárový t-test; den 56 – Tukey post-hoc test); $n = 4$



Graf č.18: Aktivita vybraných antioxidačních enzymů v prýtech u kulturního olivovníku v závislosti na opakovaném chladovém působení po 101 dnech. Text v popisu osy x označuje variantu rostlin; čísla u jednotlivých sloupců oddělená lomítkem představují teploty, kterým byly rostliny před odběrem vystaveny; $n = 1$ (směsný vzorek z cca 10 rostlin)

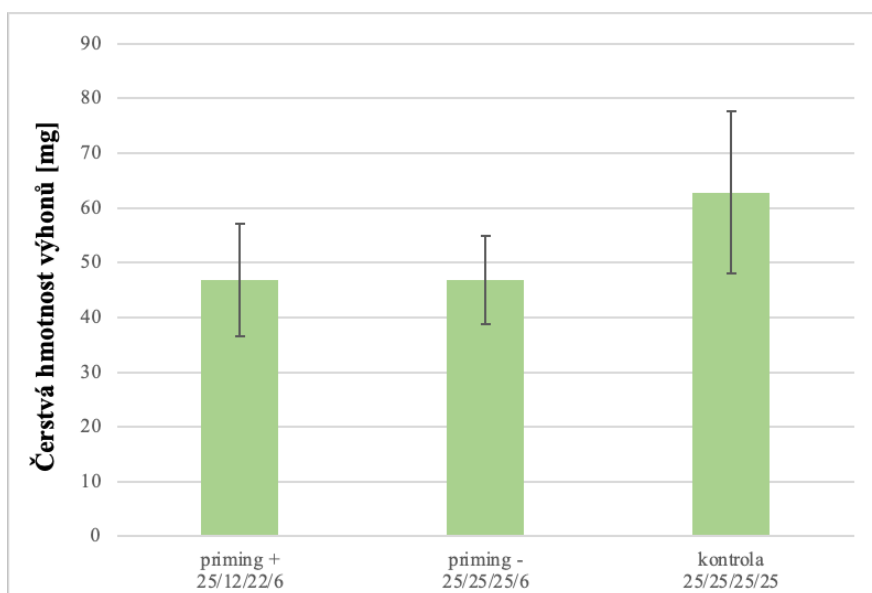
Vzhledem k vysokým nárokům na hmotnost vstupního čerstvého materiálu u metodiky pro extrakci a měření aktivity enzymů byly změřeny aktivity vybraných enzymů pouze na konci experimentu, tj. po 101 dnech. Jednalo se o optimalizaci metodiky pro náš rostlinný materiál, která byla přenesena z jiného pracoviště. Měření aktivity enzymů v prýtech kulturního olivovníku ukázalo (viz graf č.18), že námi změřené aktivity vybraných enzymů (AXP, CAT, POX) ve vzorku rostlin vystavených opakovanému chladovému působení (priming +) vykazují i po době zotavení (45 dní od 2. stresového působení) podobnou aktivitu v porovnání s kontrolou a ve dvou případech (APX a CAT) aktivitu vyšší. Jednorázové působení stresu (varianta priming -) mělo asi největší vliv na aktivitu CAT, kde můžeme pozorovat trend snížení aktivity v porovnání s kontrolou, jinak u zbývajících dvou měřených enzymů můžeme pozorovat trend velmi malého navýšení oproti kontrole.

4.2 Experimenty s *Olea europaea* ssp. *laperrinei* (planý poddruh olivovníku)

4.2.1 Reakce olivovníku na opakované působení suboptimálních teplot

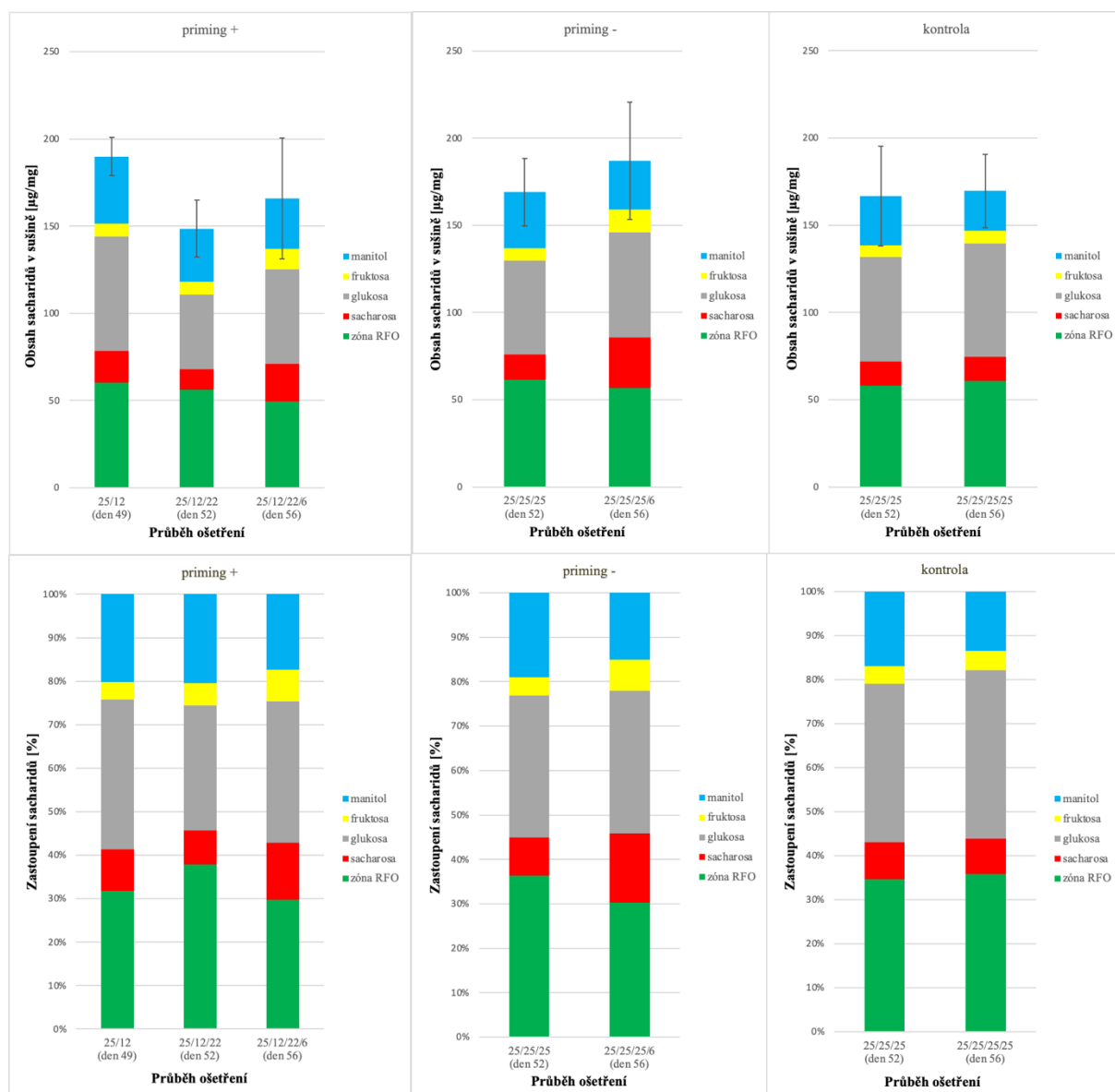
4.2.1.1 Vliv opakovaného chladového působení na růstové charakteristiky, obsah a zastoupení sacharidů (Primus 11)

Cílem experimentu bylo ověřit vliv opakovaného chladového působení na planý poddruh olivovníku. Rostliny byly rozděleny na stejné varianty jako u chladových experimentů s kulturním olivovníkem popsanych výše – priming +, priming - a kontrola a byly také vystaveny stejným chladovým teplotám. Vzhledem k menšímu počtu rostlin byl experiment doveden jen do dne 56 (odběr po 2. stresovém působení). Vzhledem k menším přírůstkům a pomalejšímu růstu rostlin variant priming + a priming - pro zhodnocení obsahu a zastoupení sacharidů byly odebírány celé nadzemní výhony. Tyto odebrané výhony byly také využity na zhodnocení růstových charakteristik.



Graf č.19: Přírůstek čerstvé hmotnosti výhonů u planého podruhu olivovníku v závislosti na opakovaném chladovém působení po 56 dnech. Text v popisu osy x označuje variantu rostlin; čísla u jednotlivých sloupců oddělená lomítkem představují teploty, kterým byly rostliny před odběrem vystaveny; chybové úsečky představují směrodatnou odchylku; $n = 4-6$

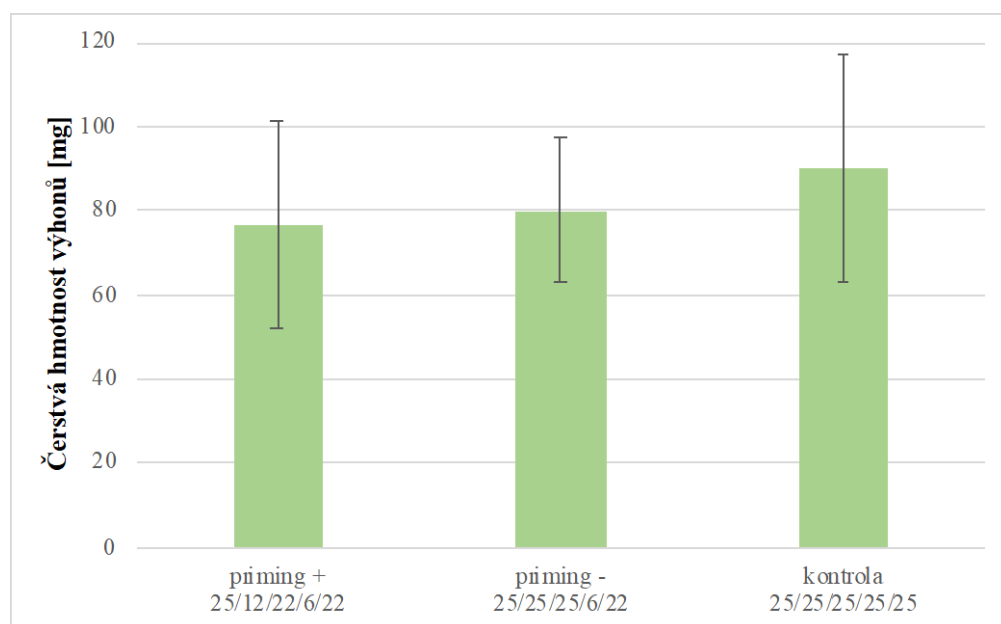
Průměrný přírůstek čerstvé hmotnosti výhonů u variant priming + i priming - po 56 dnech činil 47 mg, kontrola měla průměrný přírůstek vyšší, a to 63 mg (viz graf č.19). Mezi variantami však nebyl nalezen signifikantní rozdíl ($p = 0,095$; One-way ANOVA). Celkový průměrný obsah sacharidů byl téměř stejný při obou odběrech u kontrolní varianty (odběry 25/25/25 a 25/25/25/25) a činil 168,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW. Stejně tak jsme nezaznamenali ani žádné výraznější změny sacharidového spektra (viz graf č.20). U varianty priming + byl při prvním odběru (odběr 25/12) zaznamenán nejvyšší obsah sacharidů v celém experimentu, a to 190 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW, poté došlo k jejich snížení po fázi mezi stresovými působeními na 148 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW (odběr 25/12/22), poté bylo opět zaznamenáno zvýšení na 166 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW po vystavení silnějšímu chladovému působení (odběr 25/12/22/6). U varianty priming - jsme při prvním odběru (odběr 25/25/25) naměřili 169 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW a při druhém odběru po chladovém působení (odběr 25/25/25/6) jsme zaznamenali mírné zvýšení obsahu celkovým sacharidů na 187 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW. Ani u jedné z variant se neprokázal signifikantní rozdíl v celkových obsazích sacharidů mezi jednotlivými odběry (priming +: $p = 0,063$, Kruskal-Wallis ANOVA; priming -: $p = 0,344$, nepárový t-test; kontrola: $p = 0,857$, nepárový t-test). Co se týká zastoupení jednotlivých sacharidů, tak u obou variant priming + a priming - byl zaznamenán po silnějším chladovém působení (den 56) mírný nárůst podílu sacharosy (priming + 13 %; priming - 15%) v porovnání s kontrolní variantou (7 %) ve stejný odběrný den, naopak u dvou zmíněných variant byl patrný trend mírného snížení sacharidů komigrujících s RFO v porovnání s kontrolou.



Graf č.20: Obsah a zastoupení sacharidů v sušině prýtů planého podruhu olivovníku v závislosti na opakovaném chladovém působení. Čísla u jednotlivých sloupců oddělená lomítkem představují teploty, kterým byly rostliny před odběrem vystaveny; čísla v závorkách představují dny od počátku kultivace; nadpis značí experimentální skupinu; chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku celkových obsahů sacharidů; $n = 4-6$

4.2.1.2 Vliv opakovaného chladového působení na růstové charakteristiky, míru úniku elektrolytů, obsah a zastoupení endogenních sacharidů a aktivitu antioxidantních enzymů (Primus 14)

Jedná se o opakování experimentu Primus 11, které se povedlo dovést až do dne 101. V jednotlivých odběrných bodech byly odebrány celé výhony (přirostlý kalus + původní explantát odstraněn) na analýzu míry úniku elektrolytů. Část výhonů byla také použita pro analýzu endogenních sacharidů a zhodnocení růstových charakteristik. Nejvyšší přírůstek čerstvé hmoty byl zaznamenán u kontrolní varianty a to 90,3 mg, skupina rostlin vystavená opakovanému chladovému působení (priming +) měla přírůstek 76,8 mg a skupina rostlin vystavená jen silnějšímu chladovému působení (priming -) měla přírůstek 79,9 mg (viz graf č.21). Jedná se tak o podobný výsledek, jako v předchozím experimentu s planým poddruhem olivovníku, kde jakékoliv vystavení chladu vedlo u patřičných variant rostlin ke snížení přírůstku. V tomto případě byla také zařazena fáze zotavení (22 °C po dobu 45 dní), a tak rozdíl mezi variantami priming + spolu s priming - a kontrolou není tak velký jako v předchozím experimentu. Signifikantní rozdíl v přírůstku čerstvé hmoty se však mezi variantami rostlin nepodařilo prokázat ($p = 0,494$; One-way ANOVA).

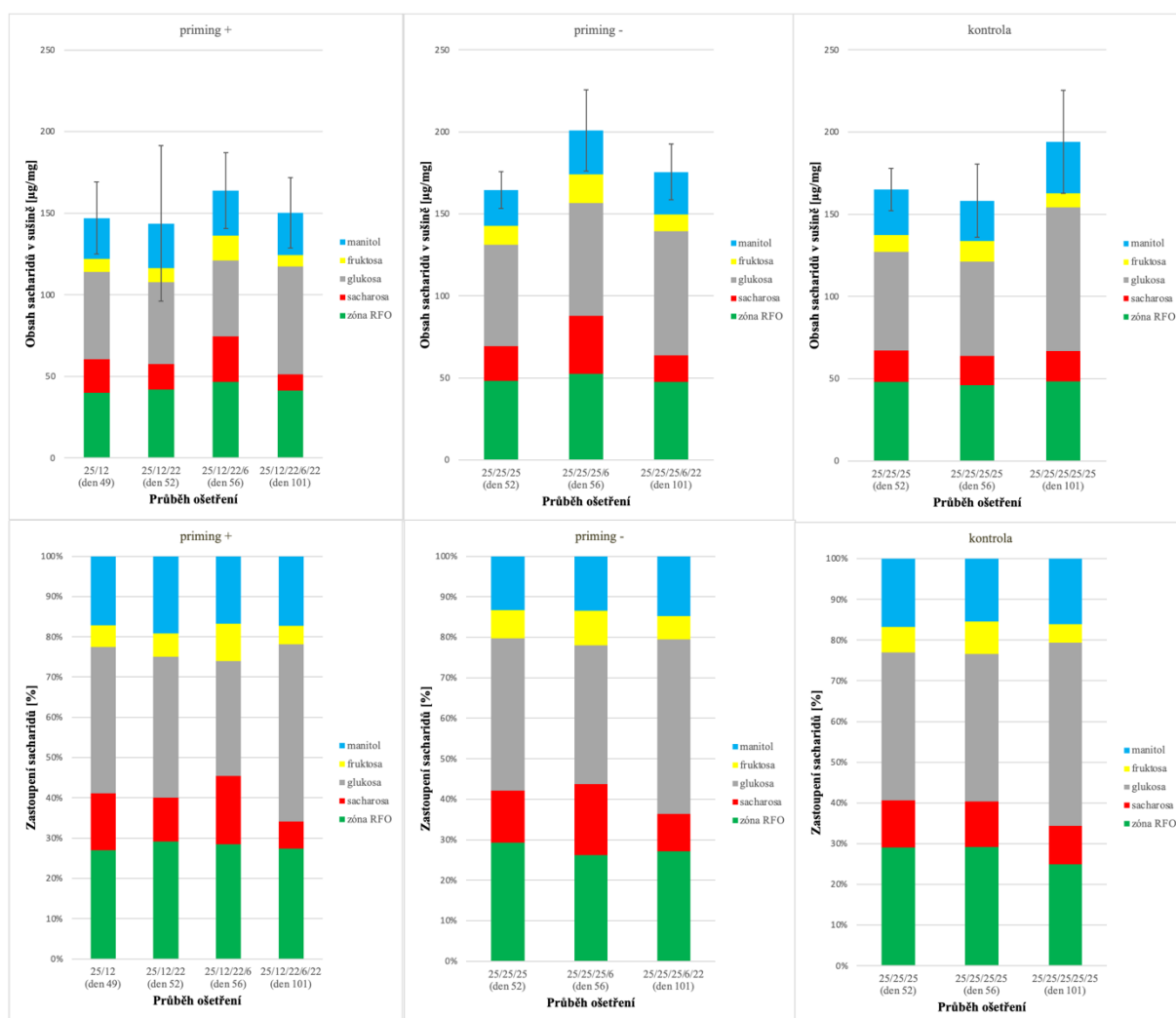


Graf č.21: Přírůstek čerstvé hmotnosti výhonů planého podruhu olivovníku v závislosti na opakovaném chladovém působení po 101 dnech. Text v popisu osy x označuje variantu rostlin; čísla u jednotlivých sloupců oddělená lomítkem představují teploty, kterým byly rostliny před odběrem vystaveny; chybové úsečky představují směrodatnou odchylku; $n = 8$

Míra úniku elektrolytů byla měřena v průběhu celého experimentu a je nutno podotknout, že naměřené hodnoty v jednotlivých bodech měly velkou variabilitu, a tudíž i velmi vysokou směrodatnou odchylku, což značně ztěžuje následnou interpretaci výsledků (viz tabulka č.9). Takovým příkladem je například varianta priming -, kde varianta rostlin před vystavením stresu (den 52) vykazovala vyšší míru úniku elektrolytů (23 %) než po následném vystavení chladu (den 56), kde míra úniku elektrolytů činila pouhých 14 %. U varianty rostlin vystavených primingu (priming +) byla po primingu naměřena míra úniku elektrolytů 19 %, po fázi mezi stresy došlo k jejímu nárůstu na 23 % a po silnějším stresovém působení zůstala na 23 %. Po fázi zotavení však tato varianta vykazovala nejmenší míru úniku elektrolytů v porovnání s ostatními variantami a to pouhých 9 %.

průběh ošetření / varianta	priming +		priming -		kontrola	
po primingu (den 48)	19%	+ - 10,90	-		-	
po fázi mezi stresy (den 52)	23%	+ - 4,70	23%	+ - 9,28	14%	+ - 3,42
po 2. stresovém působení (den 56)	23%	+ - 13,08	14%	+ - 3,80	17%	+ - 6,58
po recovery (den 101)	9%	+ - 1,03	13%	+ - 5,74	14%	+ - 2,52

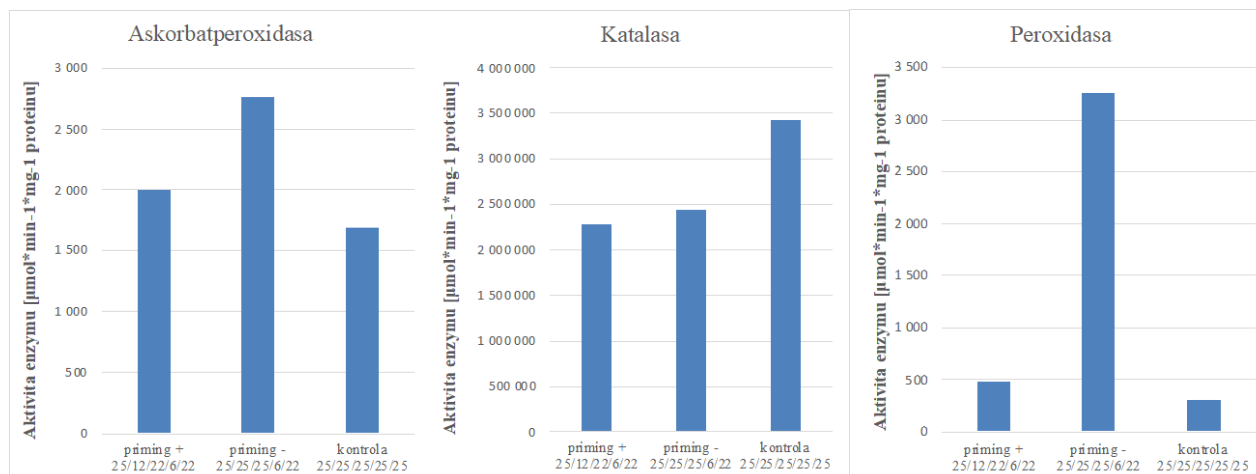
Tabulka č.9: Míra uniku elektrolytů z prýtlů planého podruhu olivovníku v závislosti na opakovaném působení chladových. Průměrná míra uniku elektrolytů z prýtlů (EL) za 24 hodin vztažená na celkový obsah elektrolytů v prýtlů u rostlin planého podruhu olivovníku po opakovaném chladovém působení; čísla napravo od hodnot EL značí směrodatnou odchylku; n = 4



Graf č.22: Obsah a zastoupení sacharidů v sušině prýtlů planého podruhu olivovníku v závislosti na opakovaném chladovém působení. Číslo u jednotlivých sloupců oddělené lomítkem představují teploty, kterým byly rostliny před odběrem vystaveny; čísla v závorkách představují dny od počátku kultivace; nadpis značí experimentální skupinu; chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku celkových obsahů sacharidů; $n = 4-6$

Průměrný obsah celkových sacharidů byl poměrně vyrovnaný napříč jednotlivými variantami a odběrnými body (viz graf č.22). U žádné varianty nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi celkovými obsahy sacharidů (priming +: $p = 0,853$; One-Way ANOVA, priming -: $p = 0,115$; One-Way ANOVA, kontrola: $p = 0,279$; One-Way ANOVA). Nejmenší obsah celkových sacharidů v sušině prýtlů byl zaznamenán u varianty priming +, kde pouze při odběru po 2. stresovém působení (varianta 25/12/22/6; den 56) celkové sacharidy přesáhly hranici 150 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW. Ostatní ex. skupiny ve všech variantách odběrů tuto hranici přesáhly vždy. Největší trend nárůstu sacharidů byl patrný u varianty priming - po stresovém působení (varianta 25/25/25/6; den 56), kdy obsah sacharidů v sušině činil 176 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Co se týká zastoupení

sacharidů, tak podobně jako u kulturního olivovníku, i zde byl trend sacharosy mírně reagovat na působení chladu. U varianty priming + bylo po primingovém působení zastoupení sacharosy 14 %, poté kleslo během fáze mezi stresy na 11,5 % a poté došlo opět k navýšení po 2. stresovém působení na 18,6 %. U varianty priming – došlo také k nárůstu sacharosy na celkovém spektru po působení stresu a to na 20 %. U kontrolní varianty výraznější posuny v zastoupení sacharosy patrné nebyly.



Graf č.23: Aktivita enzymů v prýtech u planého poddruhu olivovníku v závislosti na opakovaném chladovém působení po 101 dnech. Text v popisu osy x označuje variantu rostlin; čísla u jednotlivých sloupců oddělená lomítkem představují teploty, kterým byly rostliny před odběrem vystaveny; $n = 1$ (směsný vzorek z cca 10 rostlin)

Vzhledem k vysokým nárokům na hmotnost vstupního čerstvého materiálu u metodiky pro extrakci a měření aktivity enzymů byly změřeny aktivity vybraných enzymů pouze na konci experimentu, tj. po 101 dnech. Aktivita enzymů u vzorku z rostlin vystavených opakovanému stresu (varianta priming +) vykazovala trend podobné avšak mírně vyšší aktivity v porovnání s kontrolou u enzymů APX a POX, v případě CAT došlo ke snížení aktivity v porovnání s kontrolou (viz graf č.23). U vzorku z rostlin vystavených jednorázové působení (varianta priming -) byl pozorovatelný trend navýšení aktivity v porovnání s kontrolou u enzymů APX a POX, u enzymu CAT jsme pozorovali trend snížení aktivity.

5 Diskuse

Pro současné klima jsou typické extrémní výkyvy teplot a srážek v jednotlivých oblastech. Pro kulturní rostliny je tento stav obzvlášť závažný, protože procesy evoluční adaptace na změny podmínek jsou dlouhodobé a s ohledem na selekční tlak předchozího období je pravděpodobně u řady druhů snížena schopnost aklimační reakce. Pro rostlinné druhy jižní Evropy jsou nejvýznamnějšími abiotickými stresovými faktory extrémní sucha v kombinaci se zasolením v letních měsících, a naopak poklesy teplot v zimě pod bod mrazu. Působení těchto stresových faktorů u rostlin je doprovázeno stresem oxidativním. Negativnímu působení oxidativního stresu se rostliny brání posílením antioxidačních systémů. Hlavním cílem této práce bylo zjistit, zda se u olivovníku liší reakce vybraných složek antioxidačního systému při působení opakovaného stresu, především co se týče možné existence stresové paměti. Vzhledem k zaměření laboratoře, kde jsem diplomovou práci vypracovával, jsem se věnoval převážně měření hladin neenzymatických antioxidantů, hlavně endogenních rozpustných sacharidů. Olivovník je totiž rostlinou syntetizující širokou paletu sacharidů, mezi které patří i sacharidy s vysokým ochranným potenciálem, například manitol a RFO. Sacharidy slouží nejenom jako zdroj energie a uhlíku, ale mají i ochranný účinek v případě stresového působení. Jsou také potenciálním pohotovým nástrojem ke zhášení ROS. Je tedy možné, že některá složka sacharidového spektra vykazuje pro svůj potenciální ochranný účinek případně stresovou paměť? Dále jsme stanovili hladiny dalších složek neenzymatického antioxidačního systému v reakci na stresové působení (askorbát, antokyany). Na naše pracoviště se nám podařilo přenést a optimalizovat metodiku měření aktivity vybraných antioxidačních enzymů. Dílčím cílem práce bylo také porovnat odpověď vybraných složek antioxidačního systému u divokého poddruhu a kulturního kultivaru *Olea europaea*. Podařilo se nám získat data o reakci sacharidového metabolismu a vybraných antioxidačních enzymů u planého endemitního poddruhu *Olea europaea* ssp. *laperrinei*. Jedná se tak o unikátní data, jelikož odpovědi tohoto poddruhu na různé stresové faktory jsou zatím neznámé.

5.1 Optimalizace experimentálních kultivací

Rostliny byly kultivovány v podmínkách *in vitro*, což nám umožňovalo manipulovat kontrolovanými kultivačními podmínkami, poskytovalo nám to nezávislost na kultivační sezoně a také aseptickou kultivaci bez interferujících mikroorganismů. Kultivace *in vitro* byla také vybrána vzhledem tomu, že místo vypracování diplomové práce (Praha, Česká republika) uspokojivou sadovou kultivaci olivovníku pro experimentální účely *ex vitro* neumožňuje. Abychom se pokusili přiblížit co nejvíce přirozeným podmínkám, testovali jsme

možnost použití fotoautotrofní kultivace. Námi vyrobená polypropylenová víčka s polopropustnou membránou Suncap (Sigma-Aldrich; velikost pórů 0,04 μm) na krytí kultivačních nádob umožňují dostatečnou výměnu plynů a zároveň průhlednost fólie zaručuje dostatečnou ozáření, spolu s absencí sacharidů v médiu se tato fotoautotrofní kultivace v porovnání s mixotrofní přibližuje reálným polním podmínkám. Kozai a Kubota (2001) ve své práci popisují několik modelů dřevin, které se takto dají úspěšně kultivovat, mezi které patří například akácie, kávovník nebo borovice. Prvním experimentem bylo zjištěno, že plná fotoautotrofní kultivace se bohužel pro kultivaci olivovníku nehodí. Výhony z vysázených nodálních segmentů na médiu bez přídavku sacharidů v médiu neprorůstaly vůbec, a navíc polopropustná membrána vedla při delší kultivaci k vysychání média. Aseptické přidávání vody do média je sice řešením, jak ztrátu vody doplňovat, ale opakování tohoto zásahu během delších kultivací vedlo k častým kontaminacím rostlinného materiálu. Minimální či žádný růst olivovníků na médiu bez přídavku sacharosy také pozorovali autoři García a kol. (2002), kteří sledovali vliv množství a druhu sacharidu v médiu při prorůstání embryí olivovníku. Autoři v tomto experimentu nepoužívali krycí víčka s polopropustnou membránou, takže neprospívání rostlin v jejich uspořádání také může být způsobeno vlivem vyčerpání a následné nedostupnosti CO_2 v kultivační nádobě. Ani v našem případě, když jsme zajistili propustnost víčka pro zmíněný plyn, nevedla fotoautotrofní kultivace k růstu rostlin. K úplné fotoautotrofní kultivaci by mohlo vést také postupné snižování závislosti na sacharidech v kultivačním médiu (ve více subkultivacích), ovšem tento postup nebyl využit pro svoji časovou náročnost.

Další řešenou otázkou byl vliv použitého sacharidu při kultivaci. Výsledky ukazují, že rostliny rostou lépe na médiu obsahující sacharózu i manitol zároveň, a je to tak v souladu s pozorováními autorů Leva a kol. (2013). Manitol a sacharosa jsou hlavními fotosyntetickými produkty olivovníku, které jsou na dlouhé vzdálenosti transportovány floémem (Flora a Madore, 1993). Důvodem zlepšeného růstu na médiu obohaceném o manitol je zřejmě větší produkce ATP v průběhu katabolismu manitolu než během katabolismu stejného množství sacharosy (Conde a kol., 2006), akumulace manitolu v buňkách má také osmoprotektivní účinky a ochranné účinky před negativním působením ROS. Náš experiment ukázal, že použitý druh sacharidu má signifikantní vliv na celkové množství akumulovaných sacharidů, stejně tak má vliv na obsah akumulovaného manitolu. Rostliny kultivované zcela bez manitolu v médiu vykazovaly významnou akumulaci manitolu, což ukazuje na dostatečnou schopnost jeho syntézy *de novo*. Podíl manitolu na celkové sacharidové bilanci byl s přídavkem manitolu měl manitol mírně větší (16 % celkového obsahu sacharidů) v porovnání s rostlinami kultivovaných bez manitolu (13,5 % celkového obsahu sacharidů) a to zřejmě z toho důvodu, že dochází

částečně k jeho absorpci z média. To je v souladu s výsledky Rejšková a kol. (2007), kde například při kultivaci olivovníku na médiu s 5 % manitolu byl manitol zastoupený ve spektru měřených endogenních sacharidů z 50 %. Ve stejné práci při kultivaci na médiu s 5 % sacharosy podíl manitolu činil jen 20 %. Pro budoucí experimenty však bylo důležité ověřit, že rostliny jsou schopné syntetizovat manitol (hlavně v reakci na působení stresových faktorů) v dostatečné míře i bez exogenního přídatku manitolu, a to se povedlo prokázat. Leva a kol. (2013) popisují další vlivy kultivace olivovníku na médiu obsahující buď jen sacharosu nebo manitol. Dlouhodobá subkultivace (7 kulturací trvající 42 dní) jen na médiu se sacharosou v jejich případě nevedla k signifikantnímu rozdílu v celkové hmotnosti všech částí (kalus a nadzemní část) v porovnání s kultivací jen na manitolu, mezi variantami se však lišily přírůstky jednotlivých rostlinných orgánů. Dlouhodobá subkultivace se sacharosou také v jejich případě vedla k menšímu prodlužování výhonů a menší životnosti jednotlivých nodálních segmentů. V mé diplomové práci jsou však všechny experimentální kultivace na médiu jen se sacharosou prováděny maximálně 101 dní a žádný výraznější vliv na prodlužování jsem nepozoroval. Pro dlouhodobější (udržovací kultivace) se tak hodí kultivace na médiu obsahující oba sacharidy, avšak pro experimentální kultivace s cílem hodnotit hladiny manitolu pro jeho potenciální ochranný účinek je výhodnější kultivace jen na médiu obsahující sacharosu. Rejšková a kol. (2007) navíc ukazují, že i přes širokou škálu použitých hladin sacharosy v médiu (1 %, 3 %, 5 %, 7 % a 9 %) zůstává endogenní obsah sacharosy relativně konstantní.

5.2 Reakce olivovníku na simulovaný stres z nedostatku vody a zasolení

Přítomnost PEG v médiu (různých vyšších molekulových hmotností) pro experimenty simulující nedostupnost vody má tradici a je běžné při experimentálních kultivacích v podmínkách *in vitro* (Rai a kol., 2011). PEG je využíván jako nepenetrující osmotikum hlavně pro svoji netoxičnost pro rostlinné explantáty a chemickou inertnost (Lutts a kol., 1995; Dubois a Inzé, 2020). Je popsán i toxický efekt PEG na rostliny v souvislosti s akumulací PEG (Jacomini a kol., 1988). Použití PEG molekulárních hmotností (4000, 6000 a 8000) pro vyvolání stresu z nedostatku vody u olivovníku kultivovaného *in vitro* je ověřenou metodou a běžně jí používalo několik autorů (Baccari a kol., 2016; Silvestri a kol., 2017; Hegazi a kol., 2018). V našem případě i během několika opakování však stále nedocházelo k uspokojivému prorůstání jednotlivých explantátů při použití PEG 4000. Zásadní odlišností vůči zmiňovaným studiím bylo použití polypropylenové fólie s polopropustnou membránou. Vystavení jednotlivých primárních explantátů (nodů) osmotickému stresu díky přítomnému PEG v médiu v kombinaci s propustným víčkem přinášela rostlinám zřejmě velký stres. Lawlor (1970) popisuje, že může docházet k prostupování a akumulaci PEG v poraněných rostlinách,

koncentrace PEG v rostlinách tak závisí na míře transpirace a velikosti molekuly PEG. Lawlor poté dodává, že může dojít až k bloádě cest vody, a nakonec k zasychání. Mnou zvolená kombinace podmínek (PEG + pro plyny propustné víčko) zřejmě mohla vést ke zvýšení vstupu PEG do nodálního segmentu a postupné akumulaci PEG, což by mohlo vysvětlovat, proč vždy docházelo nejprve k aktivaci axilárních pupenů a poté k následnému žloutnutí a zaschnutí malých prýtů. Jacomini a kol. (1988) ve své práci popisuje postupnou akumulaci PEG začínající v kořenech a následně i v listech rajčete. Jedinou dlouhodobě přirůstající částí v našich experimentech s PEG byl kalus primárního explantátu, na který PEG neměl letální účinek, ale ovlivnil jen jeho růst. Tvorba kalusu je běžnou reakcí olivovníku množeného pomocí nodálních segmentů v podmínkách *in vitro*, jedná se o hojivé pletivo vznikající na spodní řezné ploše explantátu, jeho mohutnost je v daném případě ovlivněna i trans-zeatinem, který se v médiu nachází. Ze získaných dat jsme zjistili, že přidání PEG v jakékoliv koncentraci (2 % a 4 %) má signifikantně negativní dopad na růst kalusu v porovnání s kontrolou. Pro možnou vyšší toxicitu menší molekuly PEG 4000 pro mladé nodální segmenty olivovníku jsme se rozhodli v následujícím experimentu použít PEG 6000 s vyšší molekulární hmotností. Rostliny kultivované na médiu s PEG 6000 již prorůstaly podstatně lépe, nicméně stále byla patrná značná retardace růstu (viz fotografie č.4). Domnívám se, že tato retardace růstu byla zřejmě způsobená akumulací PEG jako v předchozích experimentech ovšem v menší míře, takže nebyl patrný tak silný letální účinek na prorůstající pupeny nodálních segmentů. Efekt na růst kalusu byl obdobný jako v případě použití PEG 4000, kalusy měly při obou použitých koncentracích velmi podobné hmotnosti a hmotnost kalusu měla klesající trend se zvyšující se koncentrací PEG v médiu.

Sledovaná stresová odpověď v podobě změn sacharidové bilance přinesla zjištění, že při vystavení silnějšímu působení dochází k navýšení celkového obsahu rozpustných sacharidů ve výhonech a mění se jejich jednotlivé zastoupení – navyšují se sacharidy komigrující s RFO a manitol a zároveň se snižuje zastoupení glukosy. Celkové navýšení rozpustných sacharidů v listech je v souladu s výsledky autorů Ahmadipor a kol. (2018), kteří sledovali odpověď na omezení zálivky a nedostupnost vody u olivovníku kultivovaného *in vivo*. Akumulace sacharidů v takovém případě pomáhá upravit osmotické poměry v buňce. Brito a kol. (2019) v review shrnují práce, kde suchu odolnější kultivary olivovníku také vykazují vyšší akumulaci sacharidů a jiných kompatibilních solutů jako je například prolin, ale pohled na změny ve spektrech akumulovaných sacharidů však zmiňované práce nepřináší. Námi změřená spektra naznačují, že hlavním sacharidem akumulujícím se během stresu z nedostatku vody u olivovníku jsou sacharidy komigrující s RFO a manitol. Předpokládané ochranné účinky manitolu jsou popsány již výše. Akumulace RFO je častou reakcí rostlin na stres z nedostatku

vody, další dřevinou, která tyto sacharidy akumuluje v případě stresového působení je například kávovník (Santos a kol., 2011). Tyto sacharidy jsou kompatibilními soluty (Bartels a Sunkar, 2005), dále se podílejí na stabilizaci membrán (Hinch a kol., 2003), a také se jim přisuzuje potenciální schopnost zhaset ROS (Nishizawa a kol., 2008). Pro potvrzení našich výsledků je potřeba provést více experimentů ideálně s větším počtem rostlin a opakování. Často také docházelo ke kontaminacím rostlin, a proto nemohly být odebírány vzorky v zamýšleném rozsahu. Opakovaně jsme však ověřili, že použití PEG v daném uspořádání je nevhodné pro daný typ experimentů a nepodařilo se nám najít subletální koncentrace. Přestože byl příspěvek obou námi použitých PEG k osmotickému potenciálu média téměř totožný ($-0,041$ MPa u 4% PEG 4000; $-0,037$ MPa u 4% PEG 6000) (spočítáno dle Money, 1989), na explantáty mělo použití PEG i jiný efekt, než je limitace dostupnosti vody, který zřejmě vedl k úhynu explantátu. Na jiný, než osmotický efekt PEG v tomto sestavení poukazuje i fakt, že v dalších experimentech olivovník zvládl prorůst na médiu obsahujícím 50 mM chloridu sodného, jehož příspěvek k osmotickému potenciálu média byl $-0,243$ MPa. Je důležité však zmínit, že NaCl je penetrující osmotikum, kdy vliv jím vyvolaného osmotického stresu s trváním experimentu postupně klesá. Ze všech těchto důvodů nebylo působení PEG zařazeno do plánovaného sledování efektu opakovaného stresu. Pro snížení toxického vlivu PEG bych případně zařadil fázi předpěstování na médiu bez PEG, vyměnil polypropylenové víčko s polopropustnou membránou za alobalové víčko anebo bych zvolil kombinaci obojího. Další možností optimalizace by bylo například použití PEG ještě s vyšší molekulovou hmotností.

Přechozí zahrnutí PP víček s polopropustnou membránou způsobovalo kolísání množství média a přinášelo tak další stresový prvek do experimentálního uspořádání, který ohrožoval odběr vzorků v dostatečném množství a rozsahu. Pro budoucí experimenty se nám podařilo ověřit, že průhlednost materiálu použitého na výrobu víčka krycích nádob nemá vliv na růstové charakteristiky ani na obsah a zastoupení sacharidů, proto jsme pro další experimenty zvolili použití tradičních alobalových víček.

Působení zasolení z hlediska stresových faktorů má svá specifika co do vlivu na samotné rostliny. Zasolení půdy způsobuje rostlinám stres nepřímo, jelikož vyšší koncentrace soli v prostředí ztěžují příjem vody rostlinou, a také přímo, kdy se projevuje toxický efekt iontů akumulujících se v buňkách. Pro sledování růstových charakteristik a paměťového efektu u některých složek sacharidového spektra u kulturního olivovníku jsme rostliny na začátku rozdělili do tří skupin, z nichž jedna (priming +) byla hned od začátku kultivace vystavená slabšímu působení chloridu sodného (50 mM) po dobu 45 dní. Následovalo období bez zasolení (6 dní) a poté 4 dny silnějšího působení NaCl (100 mM). Růstové charakteristiky varianty

priming + na konci experimentu nevykazovaly vyšší přírůstky v porovnání s variantou priming – či kontrolou. Nejmenší přírůstky u varianty vystavené primingu lze pravděpodobně v tomto případě přičíst tomu, že vysazený nodální segment musí energii investovat jednak do prorůstání axilárních pupenů a růstu, ale zároveň i do obranných mechanismů proti působení solného stresu. Je tedy možné, že jsme nepozorovali efekt primingu, ale spíše zpomalení růstu v důsledku dvojího stresu, na což ukazují naše data z měření růstových charakteristik v průběhu experimentu. Přenášení jednotlivých rostlin mezi jednotlivými médii mělo za následek zvýšený růst kalusu. Kultivační médium totiž obsahuje zeatin, který se při delší kultivaci v okolí explantátů pravděpodobně vyčerpává a růst kalusu se zpomalí, přenesení na nové médium způsobuje aktivaci dalšího růstu kalusu.

Výsledky měření obsahu endogenních sacharidů naznačují, že hlavním sacharidem reagujícím na stres ze zasolení je manitol. K jeho zvýšenému zastoupení ve spektru sacharidů došlo jak u varianty priming - vystavené jen silnějšímu působení (100 mM), tak i u varianty priming +. Výsledky také naznačují, že rostliny ve variantě priming + po prvotním působení slabšího stresu a při přenesení na médium bez chloridu sodného (6 dní trvající fáze mezi stresy) stále udržovaly podobné hladiny manitolu, jako při slabším působení. Při dalším přenesení rostlin této varianty na médium indukující silnější stres došlo už jen k mírnému zvýšení obsahu manitolu. Absolutní obsah manitolu po primingovém působení byl menší, ovšem jeho podíl na celkovém spektru byl větší (3,8 µg/mg FW; 44 %) v porovnání jen se silnějším působením u varianty priming - (4,6 µg/mg FW), kde jeho podíl na celkovém spektru dosahoval 35 %. Další dřevinou akumulující manitol v reakci na nedostatek vody a zasolení je i již zmiňovaný kávovník (Carvalho a kol., 2014). V jejich práci popisují akumulaci manitolu doprovázenou současným snížením obsahu fruktosy. V našem případě jsme pozorovali obdobné snížení jiné hexosy a to glukosy ve všech případech stresového působení zasolením. Abebe a kol. (2003) při pokusech s transgenní pšenicí akumulující manitol pozorovali její zvýšenou odolnost vůči zasolení a nedostatku vody. Jak je zmíněno výše, stres ze zasolení má dvojí působení na rostliny – zhoršený příjem vody rostlinou a toxicitu přijatých iontů. Akumulace manitolu v listech u olivovníku hraje aktivní roli při osmotickém přizpůsobení (Tattini a kol., 1996). To je zřejmě důvodem, proč jsme pozorovali akumulaci manitolu v experimentu se simulovaným suchem, tak i v solném experimentu. Kritickým krokem při osmotickém přizpůsobení u olivovníku je transmembránový transport manitolu (Conde a kol., 2006). Autoři Conde a kol. (2006) popisují mechanismus a přinášejí důkazy, jak dochází k synchronizaci transportu a enzymatických dějů (zodpovědných za degradaci manitolu) při akumulaci manitolu v reakci na zasolení. V jejich práci má vystavení suspenze buněk olivovníku silnějšímu působení chloridu sodného (100-500

mM) za následek zvýšení exprese transmembránového přenašeče pro manitol (*OeMat*) a transportu manitolu z média do buněk suspenze společně se snížením aktivity enzymu manitoldehydrogenasy (MTD), což v důsledku vede k akumulaci manitolu uvnitř buněk. Jednalo se tak o první práci, která popisovala přímou regulaci transportu manitolu v rostlinné říši, která je regulovaná zasolením. Další studie autorů Conde a kol. (2011) v podobném uspořádání popsala stejný efekt v reakci na simulovaný nedostatek vody přidáním PEG. Akumulaci manitolu u olivovníku při stresu ze zasolení popsalo v minulosti několik autorů (Tattini a kol., 1996; Chartzoulakis a kol., 2006). Tattini a kol. (1996) popsali zvýšený obsah manitolu v listech olivovníku kultivovaného hydroponicky po vystavení chloridu sodného, nicméně v jejich studii při zařazení fáze bez stresu došlo ke snížení obsahu manitolu zpět na kontrolní hladiny, fáze bez stresu v jejich případě trvala 14 dní. Pokud produkce, transport a akumulace manitolu skutečně vykazuje paměťový charakter při odpovědi na opakovaný stres ze zasolení, není zřejmě tento efekt delší než 14 dní. Odolnosti vůči zasolení se navíc různí mezi jednotlivými genotypy olivovníku (Gucci a Tattini, 2010), proto případný paměťový efekt může být vázán jen na některé genotypy. Vhodným kandidátem pro ověřování takového faktu může být studium planých poddruhů olivovníků, které bez domestikačního tlaku na zvýšení výnosů mohou v některých případech vykazovat větší odolnost vůči působení stresových faktorů.

5.3 Reakce olivovníků na opakované působení suboptimálních teplot

Design experimentů pro opakované chladové působení se nám jevil jako optimální pro studium stresové paměti, jelikož s rostlinami je možno manipulovat jen minimálně, díky tomu mohly být odebírány vzorky v zamýšleném rozsahu a nedocházelo tak často ke kontaminacím média. Literatura uvádí, že olivovník v podobných experimentech kultivovaný *in vitro* snáší teploty okolo $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Bartolozzi a kol., 2001). Námi zvolené teploty při provádění experimentů s neaklimatizovanými kulturami v aktivní fázi růstu dlouhodobě kultivované při $22\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro navození stresového působení byly kompromisem, jelikož mé experimenty probíhaly ve stejném kultivačním boxu paralelně s vypracováním podobných experimentů s mojí kolegyní Mgr. Gabrielou Lotovou. Musely být tedy použity teploty v takovém rozsahu, které budou subletální pro oba druhy – *O. europaea* a *Solanum tuberosum*.

Provedené chladové experimenty s kulturním olivovníkem opakovaně ukázaly, že priming (pomocí mírně snížených teplot) měl v experimentech s kulturním olivovníkem pozitivní efekt na růst rostlin. V jednom ze dvou opakování daných analýz (Primus 13) jsme prokázali signifikantní rozdíl mezi variantou priming + a kontrolou. Měření míry úniku elektrolytů navíc neukázalo výraznější rozdíl mezi rostlinami vystavenými jakémukoliv chladovému působení a kontrolou, což ukazuje na schopnost kulturního olivovníku zvládat

zvolené suboptimální teploty bez výraznější míry poškození buněk vlivem právě nízkých teplot. Je však otázkou, zda zvolené teploty skutečně byly pro kulturní olivovník dostatečně silným stresovým působením. Z literatury víme, že stejný neaklimovaný kultivar olivovníku pěstovaný *in vitro* vydrží teploty až 0 °C po dobu 30 dní (Rejšková a kol., 2007).

Rozdíl mezi experimentálními variantami byl patrný při analýze sacharidů a měření aktivity antioxidačních enzymů, kde jsme v některých případech pozorovali paměťový efekt některých složek. Jednorázové silnější působení (priming -) vedlo v jednom provedení experimentu s kulturním olivovníkem k akumulaci celkových rozpustných sacharidů (Primus 9) a v obou opakováních experimentů s danými analýzami k navýšení zastoupení sacharosy na celkovém obsahu všech měřených sacharidů. Podobný trend byl pozorovatelný také u variant priming + po vystavení druhému silnějšímu působení. V provedení experimentu Primus 12 došlo k mírnému navýšení celkových sacharidů u varianty priming + vůči kontrole po primingovém působení a tento navýšený obsah sacharidů byl patrný i během fáze mezi stresy a také po silnějším působení. Akumulace rozpustných sacharidů pomáhá vyrovnat osmotické poměry v buňce, které mohou být narušeny dehydratací v důsledku působení chladu. Naakumulované sacharidy mohou také sloužit jako zásobárna energie a pomáhají k přežití delších období chladu a sucha, včetně možného využití jako zdroje a uhlíku po odeznění stresu. V experimentu Primus 12 jsme pozorovali trend mírného navýšení sacharosy u varianty vystavené primingovému působení ve fázi mezi stresy (den 52) a toto navýšení bylo patrné i po silnějším druhém působení (den 56), což ukazuje na možný paměťový efekt. Bohužel tento jev jsme pozorovali pouze v jednom provedení experimentu. Rejšková a kol. (2007) však pozorovali akumulaci sacharidů komigrujících s RFO a manitolu v reakci na dlouhodobější vystavení chladovým teplotám. Jak jsme ukázali i v této diplomové práci, akumulace manitolu mimo jiné zřejmě závisí na přítomném manitolu v médiu, který v případě práce Rejškové a kol. mohl být způsoben právě přítomností tohoto sacharidu v médiu. Domnívám se, že záleží na délce působení chladu, které v případě kratšího působení (i opakovaného) jako v našem případě vede k akumulaci sacharosy a při delším působení dochází k akumulaci RFO. Akumulace sacharosy pomáhá chránit membrány a proteiny před poškozením v důsledku akutních změn v souvislosti s chladovým působením (chlad, dehydratace) (Hoekstra a kol., 2001), zatímco dlouhodobější akumulace RFO vede k ochraně před krystalizací sacharosy, která ve vyšších koncentracích může nastat (Caffrey, 1988). Navíc oba zmíněné sacharidy také mají potenciál zhaset volné radikály (Matros a kol, 2015; Stoyanova a kol., 2011).

V zimním období je u neopadavých dřevin běžná akumulace antokyanů v listech, pomáhají jednak chránit fotosyntetický aparát před oxidativním poškozením a také zvyšují jeho

fotosyntetickou účinnost (Zhu a kol., 2018). V našem případě jsme zaznamenali pokles obsahu antokyanů v listech při jakémkoliv vystavení chladu. Zasadit naše výsledky o poklesu antokyanů do širšího kontextu vědění je tak velmi obtížné, jelikož většina známých studií studujících obsah antokyanů u olivovníku je zaměřená hlavně na jejich obsah v plodech, a ne v listech jako v našem případě. Důvodem poklesu antokyanů by mohla být různá kvalita světla v kultivačním boxu (kontrolní rostliny) a boxu pro chladové experimenty (rostliny vystavené chladu). Liu a kol. (2018) popisují několik prací, které dokazují, že krom nízké teploty je intenzita světla a jeho kvalita (hlavně složka UV-A) jedním z nejdůležitějších faktorů, které ovlivňují akumulaci antokyanů.

Naše předběžné výsledky měření antioxidačních enzymů ukazují potenciální připravenost enzymatického antioxidačního systému u kulturního olivovníku, jelikož aktivita všech sledovaných enzymů (APX, CAT, POX) u varianty rostlin vystavených opakovanému působení (priming +) vykazovala přibližně stejnou a ve dvou případech vyšší aktivitu než kontrola (APX, CAT). Výsledky je ovšem nutno považovat za orientační, protože z časových důvodů nebylo měřeno větší množství opakování tak, aby mohlo být provedeno základní statistické hodnocení. Lukić a kol. (2020) popisují podobné zapojení antioxidačních enzymů do dlouhodobé stresové paměti v reakci na opakované vystavení suchu, enzymy zde zůstávaly v alertním stavu pro případ dalšího stresového působení ještě několik týdnů po odeznění původního stresového působení. Autoři Lukić a kol. (2020) diskutují, že zvýšená aktivita POX společně s fenoly pomáhá udržovat stabilní hladinu peroxidu vodíku, který následně zřejmě udržuje i vyšší aktivitu antioxidačních enzymů v rostlinách vystavených primingu. Jelikož se v našem měření jednalo o jeden směsný vzorek z několika rostlin, tak z našich výsledků bohužel nelze rozhodnout, zda se u kulturního olivovníku projevuje případná stresová paměť u některé ze složek antioxidačního systému. Nicméně výsledky růstových charakteristik, měření míry úniku elektrolytů a aktivity vybraných antioxidačních enzymů poukazují na schopnost zvládat námi nastavené opakované stresové působení bez většího poškození.

Úspěšně se nám podařilo provést dva experimenty s planým poddruhem olivovníku simulující opakované působení suboptimálních teplot. Experimentální médium bylo po metodickém experimentu s menším množstvím kultur (výsledky nezobrazeny) zvoleno co se týče zdroje uhlíku podobné jako pro kulturní olivovník, tedy obohacené pouze o sacharosu jako hlavní zdroj uhlíku, avšak ve vyšší koncentraci 3 %. Růstové charakteristiky spolu s analýzou míry úniku elektrolytů naznačují, že se jedná o druh spíše citlivý vůči jakémukoliv chladovému působení. Domnívám se, že metodika měření úniku elektrolytů by se pro tento divoký poddruh měla ještě optimalizovat, jelikož námi naměřené hodnoty měly v porovnání s kulturním

olivovníkem velmi vysoké směrodatné odchylky. Vysoká variabilita dat poukazuje zřejmě na vysokou citlivost materiálu jednak na působení stresových faktorů, ale také možná i na neopatrné zacházení během provádění této metodiky, hodnoty také mohou být ovlivněny použitím celých prýtů pro provádění tohoto stanovení. Hladiny rozpustných sacharidů u divokého poddruhu vykazovaly vyšší stabilitu při změnách podmínek v porovnání s kulturním olivovníkem. Ani v jednom ze dvou experimentů jsme totiž neprokázali rozdíl v celkových sacharidech mezi jednotlivým odběry u stejných variant. Trend akumulace celkových sacharidů byl pozorovatelný po jednorázovém působení (priming -) a to pouze v jednom z opakování, dále také jednou po vystavení primingu u varianty vystavované opakovanému stresu (priming +), kde ovšem nedošlo k akumulaci po vystavení 2. stresovému působení. I když nedocházelo k tak znatelnému hromadění sacharidů, téměř vždy jsme pozorovali trend navýšení podílu sacharosy na celkovém spektru analyzovaných sacharidů, jedná se tak o podobnou reakci jako v případě kulturního olivovníku. Zdá se tedy, že tuto reakci sdílí jak kulturní, tak divoký olivovník. Analýza aktivity vybraných antioxidačních enzymů v případě divokého poddruhu vykazovala odlišnou reakci v porovnání s kulturním olivovníkem. Dva (APX a POX) ze stanovovaných antioxidačních enzymů v případě opakovaného působení (priming +) vykazovaly podobnou aktivitu jako kontrolní vzorek a enzym CAT vykazoval aktivitu menší.

Studium příbuzných planých druhů je většinou slibným zdrojem informací pro šlechtění, jelikož u těchto druhů bývá odolnost vůči různým stresovým faktorům větší. Z našich dosavadních výsledků vyplývá, že námi studovaný *O. e. subsp. laperrinei* je v rozporu s naším prvotním předpokladem méně odolný vůči opakovanému chladovému působení v porovnání s jeho domestikovaným kulturním příbuzným. Námi studovaný planý poddruh olivovníku, který roste v podmínkách s podobnými výkyvy podmínek jako kulturní olivovník, se chová odlišně a vykazuje k chladu menší odolnost. Menší odolnost tohoto olivovníku souvisí zřejmě s tím, že v přirozeném prostředí se rozmnožuje hlavně vegetativně, což je součástí jeho strategie úniku před nepříznivými podmínkami, a tak chybí evoluční tlak na vytváření adaptací vůči stresu (Anthelme a kol., 2008). Vzhledem k tomu, že u kulturního olivovníku je plodnost zachovaná do vysokého věku, tak se tímto *de facto* nezáměrně šlechtí na velkou odolnost vůči silným změnám prostředí, jelikož jsou lidmi na další množení využívány pouze jedinci, které tyto výkyvy dlouhodobě přežijí. Domestikace kulturního olivovníku v historii tedy zřejmě vedla nejen k větším výnosům, ale také k vyšší odolnosti v široké škále podmínek prostředí, kde se normálně pěstuje. Zda za větší odolností kulturního olivovníku mimo jiné stojí i stresová paměť antioxidačního systému je stále otázkou, nicméně naše výsledky naznačují, že hlavně další studium aktivity antioxidačních enzymů by mohlo být slibnou cestou dalšího výzkumu.

6 Závěry

- Experimentální kultivaci rostlinného materiálu se podařilo optimalizovat a to tak, že jsme vyloučili závislost na exogenní aplikaci manitolu do média
- Nepodařilo se nalézt vhodné podmínky, které by zajišťovali uspokojivý růst při fotoautotrofni kultivaci v podmínkách *in vitro*
- Opakovaně jsme v našem uspořádání kultivace *in vitro* ověřili silné negativní působení PEG na růst rostlin olivovníku, a to při běžně používaných koncentracích
- Jednorázové i opakované zasolení způsobuje akumulaci manitolu a tato akumulace při opakovaném zasolení vykazuje paměťový efekt
- Jednorázové i opakované chladové působení u kulturního olivovníku ve vybraných případech vedlo v akumulaci sacharidů
- Jednorázové i opakované chladové působení u kulturního olivovníku vede k stabilnímu trendu navýšení sacharosy v celkové sacharidové bilanci s možným paměťovým efektem
- Žádná složka sacharidové bilance u planého olivovníku nevykazuje paměťový efekt v reakci na chladové působení
- Optimalizovali jsme metodiku stanovení aktivity vybraných antioxidačních enzymů pro daný experimentální materiál; dílčí výsledky naznačují paměťový efekt (u enzymů askorbátperoxidasy a katalasy) u kulturního olivovníku
- Nemáme důkazy o tom, že by planý olivovník vykazoval větší odolnost k chladu v porovnání s kulturním olivovníkem

7 Seznam literaturey

- Abebe T., Guenzi A.C., Martin B., Cushman J.C. (2003) Tolerance of Mannitol-Accumulating Transgenic Wheat to Water Stress and Salinity. *Plant Physiology* **131**:1748–1755.
- Ahmad P., Jaleel C.A., Salem M.A., Nabi G., Sharma S. (2010) Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology* **30**:161–175.
- Ahmadipour S., Arji I., Ebadi A., Abdossi V. (2018) Physiological and biochemical responses of some olive cultivars (*Olea europaea* L.) to water stress. *Cellular and Molecular Biology* **64**:20.
- Ahmed C.B., Rouina B.B., Boukhris M. (2008) Changes in water relations, photosynthetic activity and proline accumulation in one-year-old olive trees (*Olea europaea* L. cv. Chemlali) in response to NaCl salinity. *Acta Physiol Plant*:8.
- Alia, Pardha Saradhi P., Mohanty P. (1997) Involvement of proline in protecting thylakoid membranes against free radical-induced photodamage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **38**:253–257.
- Anthelme F., Abdoukader A., Besnard G. (2008) Distribution, shape and clonal growth of the rare endemic tree *Olea europaea* subsp. *laperrinei* (Oleaceae) in the Saharan mountains of Niger. *Plant Ecology* **198**:73–87.
- Baali-Cherif D., Besnard G. (2005) High Genetic Diversity and Clonal Growth in Relict Populations of *Olea europaea* subsp. *laperrinei* (Oleaceae) from Hoggar, Algeria. *Annals of Botany* **96**:823–830.
- Baccari S., Rkhis A.C., Chelli A., Maalej M., Abdallah F.B. (2016) Response of olive (*Olea europaea*) seedlings to in vitro water stress induced by polyethylene glycol. :6.
- Bacelar E.A., Correia C.M., Moutinho-Pereira J.M., Gonçalves C., Lopes J.I., Torres-Pereira J.M.G. (2004) Sclerophylly and leaf anatomical traits of five field-grown olive cultivars growing under drought conditions. **24**:9.
- Barranco D., Ruiz N., Campo M.G. (2005) Frost Tolerance of Eight Olive Cultivars. *HortScience* **40**:558–560.
- Bartels D., Sunkar R. (2005) Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**:23–58.
- Bartolozzi F., Mencuccini M., Fontanazza G. (2001) Enhancement of frost tolerance in olive shoots *in vitro* by cold acclimation and sucrose increase in the culture medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **67**:299–302.
- Baxter A., Mittler R., Suzuki N. (2014) ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany* **65**:1229–1240.

- Ben Abdallah M., Methenni K., Nouairi I., Zarrouk M., Youssef N.B. (2017) Drought priming improves subsequent more severe drought in a drought-sensitive cultivar of olive cv. Chétoui. *Scientia Horticulturae* **221**:43–52.
- Ben Ahmed C., Ben Rouina B., Sensoy S., Boukhriss M. (2009) Saline Water Irrigation Effects on Fruit Development, Quality, and Phenolic Composition of Virgin Olive Oils, Cv. Chemlali. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**:2803–2811.
- Besnard G., Anthelme F., Baali-Cherif D. (2012) The Laperrine's olive tree (Oleaceae): a wild genetic resource of the cultivated olive and a model-species for studying the biogeography of the Saharan Mountains. *Acta Botanica Gallica* **159**:319–328.
- Blodner C., Skroppa T., Johnsen Ø., Polle A. Freezing tolerance in two Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) progenies is physiologically correlated with drought tolerance. :10.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**:248–254.
- Brito, Dinis, Moutinho-Pereira, Correia (2019) Drought Stress Effects and Olive Tree Acclimation under a Changing Climate. *Plants* **8**:232.
- Caffrey M., Fonseca V., Leopold A.C. (1988) Relevance to anhydrous biology. **86**:5.
- Cansev A., Gulen H., Eris A. (2009) Cold-hardiness of olive (*Olea europaea* L.) cultivars in cold-acclimated and non-acclimated stages: seasonal alteration of antioxidative enzymes and dehydrin-like proteins. *The Journal of Agricultural Science* **147**:51–61.
- Carvalho K., Petkowicz C.L.O., Nagashima G.T., Bessalho Filho J.C., Vieira L.G.E., Pereira L.F.P., Domingues D.S. (2014) Homeologous genes involved in mannitol synthesis reveal unequal contributions in response to abiotic stress in *Coffea arabica*. *Molecular Genetics and Genomics* **289**:951–963.
- Chartzoulakis K., Patakas A., Bosabalidis A.M. (1999) Changes in water relations, photosynthesis and leaf anatomy induced by intermittent drought in two olive cultivars. *Environmental and Experimental Botany* **42**:113–120.
- Chartzoulakis K., Psarras G., Vemmos S., Loupassaki M., Bertaki M. (2006) Response of Two Olive Cultivars to Salt Stress and Potassium Supplement. *Journal of Plant Nutrition* **29**:2063–2078.
- Cifá D., Skrt M., Pittia P., Di Mattia C., Poklar Ulrih N. (2018) Enhanced yield of oleuropein from olive leaves using ultrasound-assisted extraction. *Food Science & Nutrition* **6**:1128–1137.
- Conde A., Silva P., Agasse A., Conde C., Geros H. (2011) Mannitol Transport and Mannitol Dehydrogenase Activities are Coordinated in *Olea europaea* Under Salt and Osmotic Stresses. *Plant and Cell Physiology* **52**:1766–1775.
- Conde C., Silva P., Agasse A., Lemoine R., Delrot S., Tavares R., Geros H. (2006) Utilization and Transport of Mannitol in *Olea europaea* and Implications for Salt Stress Tolerance. *Plant and Cell Physiology* **48**:42–53.

- Dietze M.C., Sala A., Carbone M.S., Czimczik C.I., Mantooth J.A., Richardson A.D., Vargas R. (2014) Nonstructural Carbon in Woody Plants. *Annual Review of Plant Biology* **65**:667–687.
- Drotar A., Phelps P., Fall R. (1985) Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Science* **42**:35–40.
- Dubois M., Inzé D. (2020) Plant growth under suboptimal water conditions: early responses and methods to study them. *Journal of Experimental Botany* **71**:1706–1722.
- Edziri H., Chehab H., Aissaoui F., Boujnah D., Mastouri M. (2020) Photosynthetic, anatomical and biochemical responses of olive tree (*Olea europaea*) cultivars under water stress. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*:1–7.
- Fernández J. E. (2014) Understanding olive adaptation to abiotic stresses as a tool to increase crop performance. *Environmental and Experimental Botany* **103**:158–179.
- Fernández-Escobar R. (2019) Olive Nutritional Status and Tolerance to Biotic and Abiotic Stresses. *Frontiers in Plant Science* **10**:1151.
- Fleta-Soriano E., Munné-Bosch S. (2016) Stress Memory and the Inevitable Effects of Drought: A Physiological Perspective. *Frontiers in Plant Science* **7**
- Flora L. L., Madore M. A. (1993) Stachyose and mannitol transport in olive (*Olea europaea* L.). *Planta* **189**
- Galiba G. (2010) In Vitro Adaptation for Drought and Cold Hardiness in Wheat. In: Janick J (ed) *Plant Breeding Reviews*. John Wiley & Sons, Inc., Oxford, UK, pp 115–162.
- García J.L., Troncoso J., Sarmiento R., Troncoso A. (2002) Influence of carbon source and concentration on the in vitro development of olive zygotic embryos and explants raised from them. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **69**:95–100.
- Gómez-del-Campo M., García J.M. (2012) Canopy Fruit Location Can Affect Olive Oil Quality in ‘Arbequina’ Hedgerow Orchards. *Journal of the American Oil Chemists’ Society* **89**:123–133.
- Gómez-Rico A., Salvador M.D., Moriana A., Pérez D., Olmedilla N., Ribas F., Fregapane G. (2007) Influence of different irrigation strategies in a traditional Cornicabra cv. olive orchard on virgin olive oil composition and quality. *Food Chemistry* **100**:568–578.
- Grace C.S. (2005) Phenolics as antioxidants. In: Smirnoff N (ed) *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. Blackwell Pub, Oxford ; Ames, Iowa
- Green P.S. (2002) A Revision of *Olea* L. (Oleaceae). *Kew Bulletin* **57**:91.
- Greven M., Neal S., Green S., Dichio B., Clothier B. (2009) The effects of drought on the water use, fruit development and oil yield from young olive trees. *Agricultural Water Management* **96**:1525–1531.
- *Gucci R., Mancuso S., Sebastiani L. (2003) Resistenza agli stress ambientali. In: Fiorino P. (ed.). *Olea. Trattato di Olivicoltura*, pp. 91–111.

- Gucci R., Tattini M. (2010) Salinity Tolerance in Olive. In: Janick J (ed) Horticultural Reviews. John Wiley & Sons, Inc., Oxford, UK, pp 177–214.
- Gulen H., Cansev A., Eris A. (2009) Cold hardiness of olive (*Olea europaea* L.) cultivars in cold-acclimated and non-acclimated stages: seasonal alteration of soluble sugars and phospholipids. *The Journal of Agricultural Science* **147**:459–467.
- Haddad B., Carra A., Saadi A., Haddad N., Mercati F., Gristina A.S., Boukhalfa S., Djillali A., Carimi F. (2018) In vitro propagation of the relict laperinne's olive (*Olea europaea* L. subsp. *laperrinei*). *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* **152**:621–630.
- Halliwell B. (2006) Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology* **141**:312–322.
- Hannachi H., Sommerlatte H., Breton C., Msallem M., El Gazzah M., Ben El Hadj S., Bervillé A. (2009) Oleaster (var. *sylvestris*) and subsp. *cuspidata* are suitable genetic resources for improvement of the olive (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*). *Genetic Resources and Crop Evolution* **56**:393–403.
- *Heino P., Palva E.T. (2003) Signal transduction in plant cold acclimation. In: Hirt H, Shinozaki K (eds) *Plant Responses to Abiotic Stress*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 151–186.
- Hegazi E.S.S., Allatif A.M.A., Abdel-Fattah A.A. (2018) Performance of *in vitro* propagated olive (*Olea europea* cv. *Manzanillo*) under drought stress. **15**:8.
- Hincha D.K., Zuther E., Heyer A.G. (2003) The preservation of liposomes by raffinose family oligosaccharides during drying is mediated by effects on fusion and lipid phase transitions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1612**:172–177.
- Hoekstra F.A., Golovina E.A., Buitink J. (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* **6**:431–438.
- Jacomini E., Bertani A., Mapelli S. (1988) Accumulation of polyethylene glycol 6000 and its effects on water content and carbohydrate level in water-stressed tomato plants. *Canadian Journal of Botany* **66**:970–973.
- Jiménez-Herrera R., Pacheco-López B., Peragón J. (2019) Water Stress, Irrigation and Concentrations of Pentacyclic Triterpenes and Phenols in *Olea europaea* L. cv. Picual Olive Trees. *Antioxidants* **8**:294.
- Keunen E., Peshev D., Vangronsveld J., Van Den Ende W., Cuypers A. (2013) Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept: Sugars and abiotic stress. *Plant, Cell & Environment* **36**:1242–1255.
- Kozai T., Kubota C. (2001) Developing a Photoautotrophic Micropropagation System for Woody Plants. *Journal of Plant Research* **114**:525–537.

- Lämke J., Bäurle I. (2017) Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. *Genome Biology* **18**:124.
- Larcher W. (2000) Temperature stress and survival ability of Mediterranean sclerophyllous plants. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* **134**:279–295.
- Lawlor D.W. (1970) Absorption of polyethylene glycols by plants and their effects on plant growth. *New Phytologist* **69**:501–513.
- Leva A., Sadeghi H., Petruccelli R. (2013) Carbohydrates Modulate the In Vitro Growth of Olive Microshoots. I. The Analysis of Shoot Growth and Branching Patterns. *Journal of Plant Growth Regulation* **32**:53–60.
- Liang X., Zhang L., Natarajan S.K., Becker D.F. (2013) Proline Mechanisms of Stress Survival. *Antioxidants & Redox Signaling* **19**:998–1011.
- Liu Y., Tikunov Y., Schouten R.E., Marcelis L.F.M., Visser R.G.F., Bovy A. (2018) Anthocyanin Biosynthesis and Degradation Mechanisms in Solanaceous Vegetables: A Review. *Frontiers in Chemistry* **6**:52.
- Lukić N., Kukavica B., Davidović-Plavšić B., Hasanagić D., Walter J. (2020) Plant stress memory is linked to high levels of anti-oxidative enzymes over several weeks. *Environmental and Experimental Botany* **178**:104166.
- Lutts S., Kinet J.M., Bouharmont J. (1995) Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. *Journal of Experimental Botany* **46**:1843–1852.
- Marin L., Benlloch M., Fernández-Escobar R. (1995) Screening of olive cultivars for salt tolerance. *Scientia Horticulturae* **64**:113–116.
- Matros A., Peshev D., Peukert M., Mock H.-P., Van den Ende W. (2015) Sugars as hydroxyl radical scavengers: proof-of-concept by studying the fate of sucralose in Arabidopsis. *The Plant Journal* **82**:822–839.
- Matysik J., Alia, Bhalu B., Mohanty P. (2002) Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. **82**:525–532.
- Melgar J.C., Benlloch M., Fernández-Escobar R. (2006) Calcium increases sodium exclusion in olive plants. *Scientia Horticulturae* **109**:303–305.
- Melgar J.C., Benlloch M., Fernández-Escobar R. (2007) Calcium starvation increases salt susceptibility in olive plants but has no effect on susceptibility to water stress. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **82**:622–626.
- Millar A.H., Mittova V., Kiddle G., Heazlewood J.L., Bartoli C.G., Theodoulou F.L., Foyer C.H. (2003) Control of Ascorbate Synthesis by Respiration and Its Implications for Stress Responses. *Plant Physiology* **133**:443–447.

- Money N.P. (1989) Osmotic Pressure of Aqueous Polyethylene Glycols: Relationship between Molecular Weight and Vapor Pressure Deficit. *Plant Physiology* **91**:766–769.
- Moshtaghi E.A., Shahsavari A.R., Taslimpour M.R. (2009) Ionic Leakage as Indicators of Cold Hardiness in Olive (*Olea europaea* L.). :3.
- Murashige T., Skoog F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**:473–497.
- Nikiforou C., Manetas Y. (2017) Ecological stress memory: Evidence in two out of seven species through the examination of the relationship between leaf fluctuating asymmetry and photosynthesis. *Ecological Indicators* **74**:530–534.
- Nishizawa A., Yabuta Y., Shigeoka S. (2008) Galactinol and Raffinose Constitute a Novel Function to Protect Plants from Oxidative Damage. *Plant physiology* **147**:1251–1263.
- Noctor G., Foyer C.H. (1998) ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**:249–279.
- Omar H.S. (2010) Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. *Scientia Pharmaceutica* **78**:133–154.
- Orlandi F., Garcia-Mozo H., Ezquerro L.V., Romano B., Dominguez E., Galan C., Fornaciari M. (2004) Phenological olive chilling requirements in Umbria (Italy) and Andalusia (Spain). *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* **138**:111–116.
- Ortega-García F., Peragón J. (2009) The response of phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase and phenols to cold stress in the olive tree (*Olea europaea* L. cv. Picual): Response of PAL, PPO and oleuropein to cold stress in olive tree. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **89**:1565–1573.
- Peshev D., Vergauwen R., Moglia A., Hideg É., Van den Ende W. (2013) Towards understanding vacuolar antioxidant mechanisms: a role for fructans? *Journal of Experimental Botany* **64**:1025–1038.
- Petridis A., Therios I., Samouris G., Tananaki C. (2012) Salinity-induced changes in phenolic compounds in leaves and roots of four olive cultivars (*Olea europaea* L.) and their relationship to antioxidant activity. *Environmental and Experimental Botany* **79**:37–43.
- Pospíšil P. (2009) Production of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1787**:1151–1160.
- Preedy V.R., Watson R.R. (2010) *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Elsevier, Amsterdam.
- Rai M.K., Kalia R.K., Singh R., Gangola M.P., Dhawan A.K. (2011) Developing stress tolerant plants through in vitro selection—An overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany* **71**:89–98.

- Ranalli A., Contento S., Lucera L., Di Febo M., Marchegiani D., Di Fonzo V. (2006) Factors Affecting the Contents of Iridoid Oleuropein in Olive Leaves (*Olea europaea* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**:434–440.
- Regni L., Palmerini C.A. (2019) Behavior of Four Olive Cultivars During Salt stress. Frontiers in Plant Science **10**:9.
- Rejšková A., Patková L., Stodůlková E., Lipavská H. (2007) The effect of abiotic stresses on carbohydrate status of olive shoots (*Olea europaea* L.) under in vitro conditions. Journal of Plant Physiology **164**:174–184.
- Saadati S., Baninasab B., Mobli M., Gholami M. (2020) Cold Tolerance in Olive Leaves of Three Cultivars Related to Some Physiological Parameters during Cold Acclimation and De-Acclimation Stages. mdrsjms **22**:1313–1326.
- dos Santos T.B., Budzinski I.G.F., Marur C.J., Petkowicz C.L.O., Pereira L.F.P., Vieira L.G.E. (2011) Expression of three galactinol synthase isoforms in *Coffea arabica* L. and accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses. Plant Physiology and Biochemistry **49**:441–448.
- Sanzani S.M., Schena L., Nigro F., Sergeeva V., Ippolito A., Salerno M.G. (2012) ABIOTIC DISEASES OF OLIVE. Journal of Plant Pathology:24.
- Sasaki H., Ichimura K., Okada K., Oda M. (1998) Freezing tolerance and soluble sugar contents affected by water stress during cold-acclimation and de-acclimation in cabbage seedlings. Scientia Horticulturae **76**:161–169.
- Sebastiani L. (2018) Abiotic stresses in olive: physiological and molecular mechanisms. Acta Horticulturae:47–56.
- Servili M., Esposito S., Fabiani R., Urbani S., Taticchi A., Mariucci F., Selvaggini R., Montedoro G.F. (2009) Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. Inflammopharmacology **17**:76–84.
- Si T., Wang X., Huang M., Cai J., Zhou Q., Dai T., Jiang D. (2019) Double benefits of mechanical wounding in enhancing chilling tolerance and lodging resistance in wheat plants (W. Adams, Ed.). Plant Biology **21**:813–824.
- Silvestri C., Celletti S., Cristofori V., Astolfi S., Ruggiero B., Rugini E. (2017) Olive (*Olea europaea* L.) plants transgenic for tobacco osmotin gene are less sensitive to in vitro-induced drought stress. Acta Physiologiae Plantarum **39**:229.
- Štěpánová N. (2020) Vliv aplikace meta-topolinu na průběh somatické embryogeneze smrku ztepilého. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta
- Stoyanova S., Geuns J., Hideg É., Van Den Ende W. (2011) The food additives inulin and stevioside counteract oxidative stress. International Journal of Food Sciences and Nutrition **62**:207–214.

- Tattini M., Gucci R., Romani A., Baldi A., Everard J.D. (1996) Changes in non-structural carbohydrates in olive (*Olea europaea*) leaves during root zone salinity stress. *Physiologia Plantarum* **98**:117–124.
- Tayefi-Nasrabadi H., Dehghan G., Daeihassani B., Movafegi A., Samadi A. Some biochemical properties of guaiacol peroxidases as modified by salt stress in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive safflower (*Carthamus tinctorius* L.cv.) cultivars. :13.
- Tietel Z., Dag A., Yermiyahu U., Zipori I., Beiersdorf I., Krispin S., Ben-Gal A. (2019) Irrigation-induced salinity affects olive oil quality and health-promoting properties: Irrigation-induced salinity affects olive oil quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **99**:1180–1189.
- Trabelsi L., Gargouri K., Ben Hassena A., Mbadra C., Ghrab M., Ncube B., Van Staden J., Gargouri R. (2019) Impact of drought and salinity on olive water status and physiological performance in an arid climate. *Agricultural Water Management* **213**:749–759.
- Vanacker H., Carver T.L.W., Foyer C.H. (1998) Pathogen-Induced Changes in the Antioxidant Status of the Apoplast in Barley Leaves. *Plant Physiology* **117**:1103–1114.
- Veljović Jovanović S., Kukavica B., Vidović M., Morina F., Menckhoff L. (2018) Class III Peroxidases: Functions, Localization and Redox Regulation of Isoenzymes. In: Gupta DK, Palma JM, Corpas FJ (eds) *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*. Springer International Publishing, Cham, pp 269–300.
- Verma S., Dubey R.S. (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* **164**:645–655.
- Welling A., Moritz T., Palva E.T., Junttila O. (2002) Independent Activation of Cold Acclimation by Low Temperature and Short Photoperiod in Hybrid Aspen. *Plant Physiology* **129**:1633–1641.
- Yamani E.M., Sakar E., Boussakouran A., Rharrabti Y. (2019) Physiological and biochemical responses of young olive trees (*Olea europaea* L.) to water stress during flowering. *Archives of Biological Sciences* **71**:123–132.
- Young A.J. (1991) The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiologia Plantarum* **83**:702–708.
- Zhu H., Zhang T.J., Zheng J., Huang X.D., Yu Z.C., Peng C.L., Chow W.S. (2018) Anthocyanins function as a light attenuator to compensate for insufficient photoprotection mediated by nonphotochemical quenching in young leaves of *Acmena acuminatissima* in winter. *Photosynthetica* **56**:445–454.

* označuje sekundární citaci